



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
HENRIQUE SANTILLO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *stricto sensu* EM CIÊNCIAS  
MOLECULARES

LORENA FURRIEL DE PAULA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E HIDRÓLISE  
ENZIMÁTICA DA CASCA DA *MYRCIARIA JABUTICABA* (VELL)  
*BERG* (JABUTICABA SABARÁ)**

ANÁPOLIS- GO  
2016

LORENA FURRIEL DE PAULA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA  
DA CASCA DA *MYRCIARIA JABUTICABA (VELL) BERG*  
(JABUTICABA SABARÁ)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Valdirene Neves Monteiro

ANÁPOLIS – GO

2016

Paula, Lorena Furriel De.

Caracterização físico-química e hidrólise enzimática da casca da *Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg (Jaboticaba Sabará). – 2016.

75 folhas. il figuras.

Orientador: Prof . Dra Valdirene Neves Monteiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2016.

1. Materiais lignocelulósicos. 2. Hidrólise enzimática. 3. Pré-tratamento. I. Título.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA  
CASCA DA *Myrciaria jaboticaba* (VELL) BERG (JABUTICABA SABARÁ)

LORENA FURRIEL DE PAULA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do  
Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da  
Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos  
necessários para obtenção do título de Mestra em Ciências Moleculares.

Aprovada em 07/10/2016 por:

Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro  
Presidente da Banca - UEG

Profa. Dra. Maísa Borges Costa  
Membro Interno - UEG

Profa. Dra. Cleide Sandra Tavares Araújo  
Membro Externo - UEG

# DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus avós Maria França de Paula e José Abílio  
Furriel (in memoriam) que tanto se orgulharam das minhas conquistas.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus que esteve comigo em todos os momentos, me dando força e me sustentando com Sua poderosa mão.

À minha mãe Flávia Furriel que me apoiou e sempre me incentivou a continuar estudando para que eu tivesse um futuro melhor. Sem os seus conselhos com certeza não teria chegado até aqui. Obrigada mãe!

Às minhas irmãs Lorraine e Lauriane que tanto me incentivaram e se alegraram com as minhas conquistas.

Ao meu querido esposo Supercil que esteve comigo, me dedicando tantos cuidados e amor desde o dia em que nos conhecemos. Obrigada por me amar mesmo com o pouco tempo que tenho para retribuir. “...O amor é paciente, o amor é bondoso. Não inveja, não se vangloria, não se orgulha... Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta...”

À professora Valdirene Neves pela orientação, ensinamentos, compreensão, amizade e paciência durante a elaboração deste trabalho. Obrigada por todo incentivo para o meu crescimento intelectual.

Aos professores Cirano e Roberto por toda colaboração para que esse trabalho fosse concluído.

*“... nunca deixe que lhe digam  
que não vale a pena acreditar no sonho que se tem  
ou que seus planos nunca vão dar certo  
ou que você nunca vai ser alguém...”*

*Quem acredita sempre alcança...*

Mais uma vez

Flávio Venturini e Renato Russo

## RESUMO

Com o crescente interesse da utilização de recursos naturais renováveis para a produção de biocombustíveis, os materiais lignocelulósicos tem se tornado um grande alvo de pesquisadores. A utilização de resíduos agroindustriais como fonte de materiais lignocelulósicos é uma alternativa viável para o aproveitamento desses materiais de baixo custo e grande disponibilidade. No presente trabalho foram determinadas as características físico-químicas da casca de jabuticaba, o material apresentou uma composição de 20,63% de celulose, 13,69% de hemicelulose, 24,33% de lignina e 41,34% de holocelulose. A quantidade de proteínas, lipídeos, açúcares totais, umidade e cinzas foram respectivamente em g/100g de casca: 9,82, 1,97, 66,85, 79,61 e 0,593. Foi realizada a hidrólise enzimática com uma combinação das enzimas celulasas e  $\beta$ -glicosidasas 20U/10U na casca de jabuticaba tratada e não tratada com ácido sulfúrico 1% (m/v) e avaliada a hidrólise enzimática em diferentes tempos reacionais (24, 48, 72, 96 e 120 horas). Verificou-se que o tempo de 72 h foi o que apresentou melhores resultados na expressão de açúcares.

**Palavras-chave:** Materiais lignocelulósicos, hidrólise enzimática, pré-tratamento.

## **ABSTRACT**

With the growing interest in the use of renewable natural resources for the production of biofuels, lignocellulosic materials has become a major target for researchers. The use of agro-industrial waste as a source of lignocellulosic materials is a viable alternative to the use of these low-cost and widely available materials. In this work were determined the physicochemical characteristics of jabuticaba shell, the material had a composition of 20.63% cellulose, 13.69% hemicellulose, lignin 24.33% and 41.34% of holocelulose. The amount of proteins, lipids, total sugars, moisture and ash were respectively in g / 100g bark: 9.82, 1.97, 66.85, 79.61 and 0.593. enzymatic hydrolysis with a combination of cellulase enzymes and  $\beta$ -glucosidase 20U / 10U in jabuticaba peel treated and not treated with sulfuric acid 1% was obtained (w / v) and evaluated enzymatic hydrolysis at different reaction times (24, 48, 72, 96 and 120 hours). It was found that the time 72 h showed the best results in expression sugars.

Keywords: lignocellulosic materials, enzymatic hydrolysis pretreatment

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica. ....	21
Figura 2- Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de $\beta$ -D-glicose produzindo a celobiose.....	22
Figura 3- Representação da cadeia linear da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose.....	22
Figura 4- Formação das ligações de hidrogênio na estrutura supramolecular da celulose.....	23
Figura 5- Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. 5a-1) D-Glucose, 2) D-Galactose, 3) L-Arabinose, 4) D-Xilose, 5) D-Manose, 6) 4-O-metil-D-glucurônico, 7) L-Ramnose.....	24
Figura 5b- Representação esquemática da hemicelulose.....	25
Figura 6- Representação esquemática da lignina de eucalipto. ....	26
Figura 7- Estrutura dos alcoóis precursores da lignina. ....	26
Figura 8- Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.....	29
Figura 9- Representação esquemática das alterações do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento. ....	30
Figura 10- Modo de ação de celulases sobre a celulose. ....	34
Figura 11- Representação do sítio ativo (SA) das endoglucanases em forma de chave.....	35
Figura 12- Representação do modo de ação da celobio-hidrolase I (CBH I) e celobio-hidrolase II (CBH II).....	37

Figura 13- Representação do modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.....	38
Figura 14- I-Jaboticabeira adulta. II- Flores brancas da jaboticabeira. III- Jaboticaba verde. IV- Jaboticaba vermelha (processo de amadurecimento). V- Jaboticaba negra (madura). .....	39
Figura 15- Partes da jaboticaba.....	40
Figura 16- Porcentagem de glicose liberada após a hidrólise de cascas de jaboticaba tratados utilizando enzimas comerciais (celulase e $\beta$ -glicosidase) sob diferentes concentrações.. .....	58
Figura 17- Microscopia eletrônica de varredura da casca de jaboticaba antes do tratamento.....	59
Figura 18- Microscopia eletrônica de varredura da superfície da casca de jaboticaba após o tratamento com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 1%. .....	59
Figura 19- Termograma da casca de jaboticaba antes do pré- tratamento.....	60
Figura 20- Termograma da casca de jaboticaba após o tratamento com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 1%. .....	61
Figura 21- Cromatogramas de CLAE obtidos a partir da hidrólise enzimática empregando celulase e $\beta$ -glicosidase 20U/10U na casca de jaboticaba sem o pré-tratamento (ST) e tratadas com ácido sulfúrico 1% (m/v) (T). Os tempos reacionais foram de 24, 48, 72, 96 e 120 horas e estão demonstrados na figura 18 com a legenda de A, B, C, D e E respectivamente. ....	66

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1- Vantagens e desvantagens de m	FFonte: Santos et al., 2012.dos
materiais lignocelulósicos .....	31
Quadro 2 - Avaliação das características físicas e químicas da casca de Jaboticaba .....	53
Quadro 3- Composição centesimal da casca de frutas (g/100g).....	54
Quadro 4 - Composição das principais estruturas na casca de jaboticaba.....	55
Quadro 5 - Composição química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos...	56

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Concentração em $\mu\text{g/mL}$ dos açúcares obtidos após a hidrólise enzimática da casca de jabuticaba sem pré-tratamento (ST) e Tratadas com $\text{H}_2\text{SO}_4$ 1% (T) nos tempos reacionais de 24, 48, 72, 96 e 120h em relação à 10g de casca se jabuticaba.....	67
---	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ATG- Análise termogravimétrica

BG-  $\beta$ -glicosidase

CBH- Celobio-hidrolase

CBH I- Celobio-hidrolase I

CBH II- Celobio-hidrolase II

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EnG- Endoglucanase

ExG- Exoglucanase

GH- Glucano-hidrolase

GP- Grau de polimerização

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

NR- Não redutores

SA- Sítio ativo

ST- Sem pré-tratamento

T- Tratadas

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	20
2.2. CELULOSE.....	21
2.3. HEMICELULOSE .....	24
2.4. LIGNINA.....	25
2.5. EXTRATIVOS .....	27
2.6. PRÉ-TRATAMENTOS DE LIGNOCELULÓSICOS .....	28
2.7. CELULASES .....	32
2.8. ENDOGLUCANASES.....	35
2.9. EXOGLUCANASES .....	36
2.10. β-GLICOSIDASES .....	37
2.11. JABUTICABA .....	39
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. OBJETIVO GERAL.....	42
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. REAGENTES.....	43
4.2. MATÉRIA-PRIMA.....	43
4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	44
4.3.1. Determinação de umidade .....	44

4.3.2. Determinação de cinzas.....	44
4.3.3. Determinação de carboidratos .....	45
4.3.4. Determinação de proteínas .....	45
4.3.5. Determinação de Lipídios Totais .....	46
4.3.6. Determinação de Holocelulose.....	47
4.3.7. Determinação de Celulose.....	47
4.3.8. Determinação do teor de Lignina solúvel e insolúvel.....	48
4.4. PRÉ-TRATAMENTO.....	50
4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	50
4.6. HIDRÓLISE DA BIOMASSA DE JABUTICABA .....	51
4.7. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES ..	51
4.8. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA .....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	70

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente há um grande interesse mundial em novas tecnologias, produtos e processos químicos que envolvam menores impactos ambientais (GOLDEMBERG, 2009). Assim materiais que garantam biodegradabilidade e sustentabilidade estão sendo avaliados. A biomassa além de apresentar esses quesitos, é um produto renovável e por isso pode ser cultivada, obtida como resíduo da agroindústria ou, de maneira correta, pode ser retirada do ambiente de modo a não degradá-lo (SILVA et al., 2009).

Um tipo de biomassa renovável que se encontra em evidência, por apresentarem alta disponibilidade, são os materiais lignocelulósicos. Por esse motivo, vários estudos têm sido voltados para a biodegradação dos mesmos (AGUIAR; FERRAZ, 2011).

Esses materiais apresentam baixa degradação por conterem barreiras físicas resistentes compostas por lignina, que por sua vez impedem o aproveitamento da celulose. Assim para a utilização da mesma é fundamental a aplicação de uma etapa de pré-tratamento, que tem função de reduzir o teor de lignina e disponibilizar a celulose para a hidrólise enzimática por celulasas (REYES; PERALTA-ZAMORRA; DURÁN, 1998).

Essas técnicas de pré-tratamento se baseiam em diversos processos como mecânicos, físicos, biológicos ou a combinação destes. Destes processos, os que estão em destaque são aqueles que empregam ácidos, bases, explosão a vapor, água quente, amônia líquida, e outros agentes (PITARELO, 2007).

Os polissacarídeos constituintes da matéria-prima devem ser hidrolisados em seus açúcares monoméricos correspondentes através de um processo de hidrólise, os quais são fontes de carbono para um processo fermentativo

podendo originar, através de bioconversões, produtos de interesse comercial (PEREIRA, 2007).

A jabuticabeira é uma árvore nativa do Brasil, originária do Centro-Sul, pertence à família Myrtaceae, e dentre as espécies atualmente conhecidas, destaca-se a *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg e a *Myrciaria jabuticaba* (Vell) Berg. Apresenta frutos classificados como bacilo globoso, com 20 a 30mm de diâmetro, polpa macia, esbranquiçada e succulenta de sabor sub-ácido que tem embebida de uma a quatro sementes (ASCHERI, ASCHERI, CARVALHO, 2006).

A jabuticaba pode ser utilizada de muitas maneiras, como no consumo *in natura* ou na forma de geléias, e sua polpa fermentada pode produzir produtos fermentados, o que inclui licor, vinho ou vinagre. Entretanto, na fabricação de alguns desses produtos, normalmente as cascas e as sementes são desprezadas ou não são aproveitadas, mesmo representando aproximadamente 50% da fruta. Um aproveitamento adequado desses componentes poderia aumentar o valor agregado do fruto. As cascas de jabuticaba apresentam teores de fibras insolúveis de aproximadamente 27%, sendo que essas fibras insolúveis incluem alguns componentes como celulose, algumas hemiceluloses e lignina (LIMA et al., 2008).

É crescente o interesse pela otimização na obtenção do etanol celulósico, visto que, a celulose corresponde à substância de maior concentração na biomassa e apresenta uma alta eficiência para produção de etanol quando submetido a reações de hidrólise (SANTOS et al., 2012). O processo envolve basicamente quatro etapas: (I) pré-tratamento, para romper a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica; (II) hidrólise enzimática, para hidrolisar os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis; (III) fermentação, para converter os açúcares em etanol e (IV) destilação, que visa à separação de

componentes de uma mistura, de acordo com a volatilidade relativa dos componentes (SANTOS et al., 2012).

Neste trabalho foi realizada a caracterização físico-química da casca de jaboticaba Sabará, a fim de conhecer as suas características e propriedades, além de verificar a eficiência do pré-tratamento ácido pela conversão de celulose em glicose por meio da sacarificação enzimática de celulasas e  $\beta$ -glicosidasas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS**

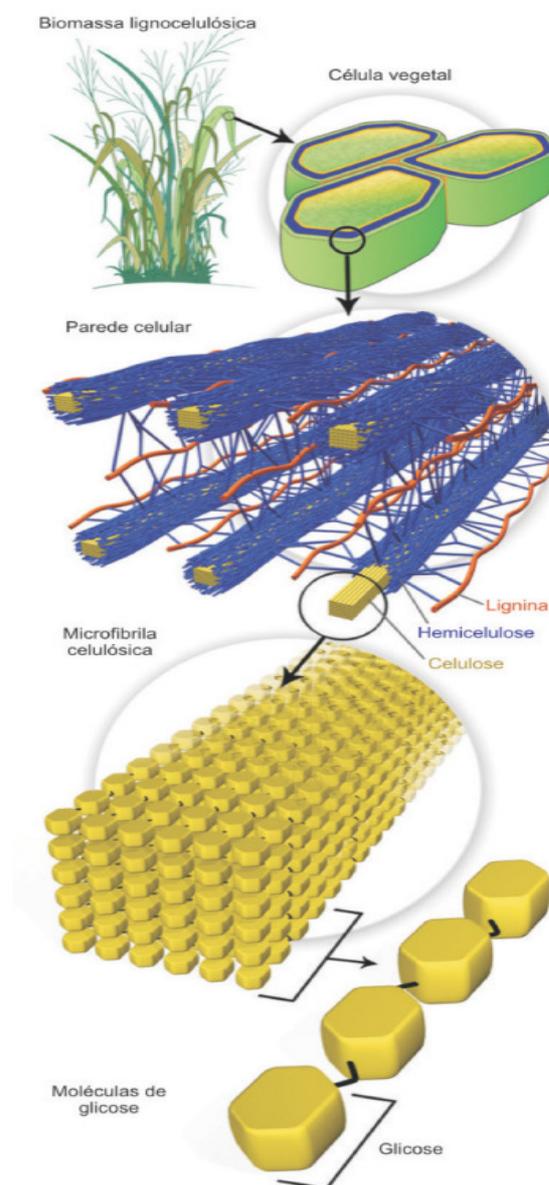
A biodegradação de materiais lignocelulósicos tem sido alvo de vários estudos, pois apresentam baixo custo e são disponibilizados cerca de 200 bilhões de toneladas no mundo anualmente. Dentre as várias aplicações, podem ser utilizados nas indústrias químicas e biológicas, além da utilização na fabricação de etanol celulósico (ZHANG et al., 2007, AGUIAR; FERRAZ, 2011).

Os materiais lignocelulósicos apresentam em sua composição 97 a 99% da fração polimérica de celulose, hemicelulose e lignina, que são ligadas entre si por ligações do tipo covalente que formam uma rede complexa resistentes ao ataque microbiano, apresentando assim, uma estrutura bastante recalcitrante difícil de ser desestruturada e convertida em monossacarídeos fermentescíveis (JEFFRIES,1990).

Essa composição química dos materiais lignocelulósicos, pode variar conforme o tamanho e a forma da parede celular da espécie envolvida, mas geralmente, a celulose encontra-se em maior proporção seguida da hemicelulose e da lignina (CASTRO & PEREIRA JR, 2010).

A figura 1 representa um esquema que mostra a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica.

Figura 1- Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica.



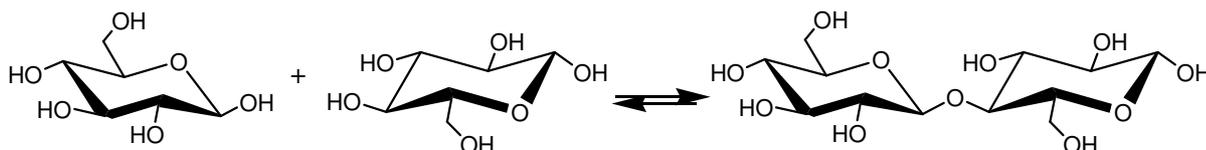
Fonte: SANTOS et al., 2012.

## 2.2. CELULOSE

Nos materiais lignocelulósicos a celulose corresponde cerca de 50% do total da sua massa seca. É um polímero formado por ligações de anidro-glicose

que estão ligadas entre si por ligações  $\beta$ -(1-4) glicosídicas conforme demonstrado na figura 2 (FENGEL; WEGENER, 1989; HENRIKSSON, LENNHOLM, 2009).

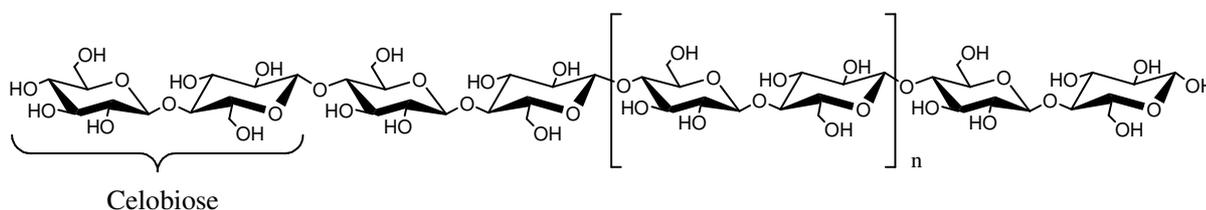
Figura 2- Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de  $\beta$ -D-glicose produzindo a celobiose.



Fonte: SOLOMONS, 1996.

Com o intuito de adquirir uma maior estabilidade em sua estrutura, as unidades de celulose ligam-se entre si por meio de ligações de hidrogênio, que são beneficiadas pela rotação de  $180^\circ$  da segunda unidade de glicose em relação à primeira, e assim sucessivamente conforme pode ser observado na figura 3. Sendo assim, a celobiose se torna a unidade conformacional mínima da celulose, enquanto a glicose representa a unidade fundamental das cadeias do homopolímero (MARTINS, 2005).

Figura 3- Representação da cadeia linear da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose.

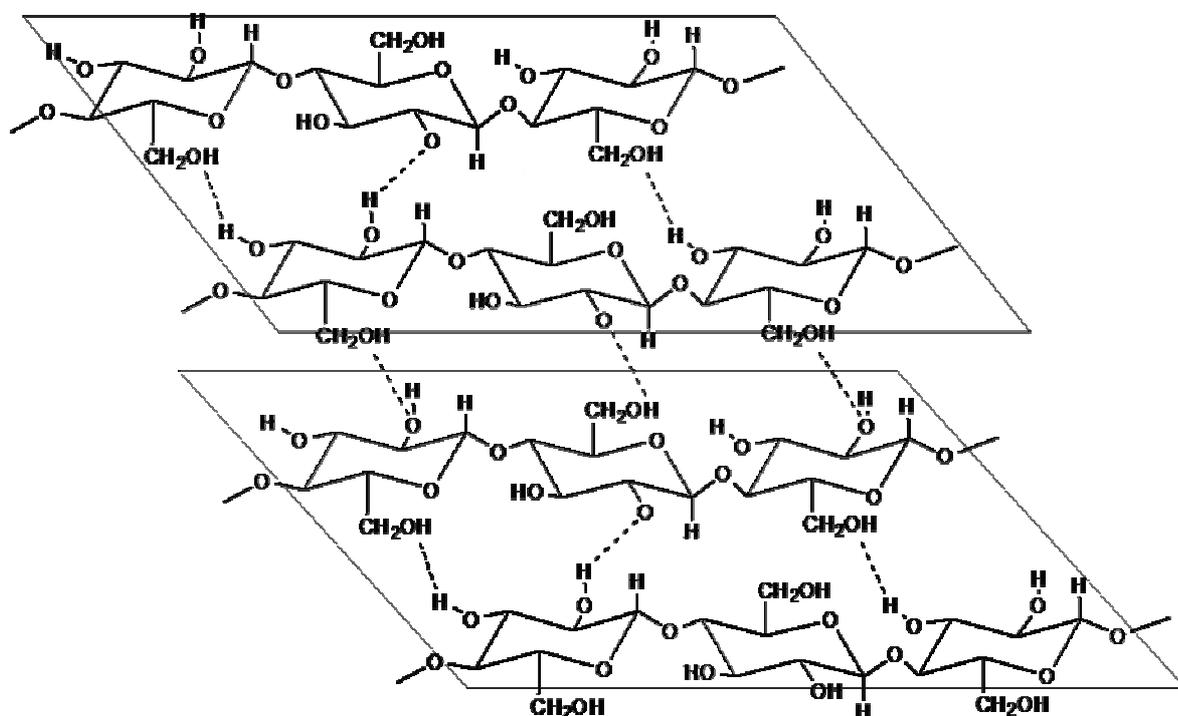


Fonte: MARTINS, 2005.

O tamanho de cada cadeia de celulose é determinado pelo grau de polimerização (GP), que evidencia a quantidade de unidades de glicose que formam a cadeia polimérica. O GP da celulose varia conforme sua origem, ou seja, irá depender da maturação da parede celular, seu envelhecimento e o processamento a que as fibras foram submetidas (TÍMÁR-BALÁZSY e EASTOP, 1998).

A celulose é um homopolissacarídeo linear que possui em sua estrutura supramolecular porções amorfas e cristalinas. A fração amorfa apresenta cadeias com orientação randomizada, já a porção cristalina apresenta orientação altamente ordenada, que são estabilizadas por ligações de hidrogênio, intra e intermolecular, conforme demonstrado na figura 4 (FAN, GHARPURAY, LEE, 1987).

Figura 4- Formação das ligações de hidrogênio na estrutura supramolecular da celulose.



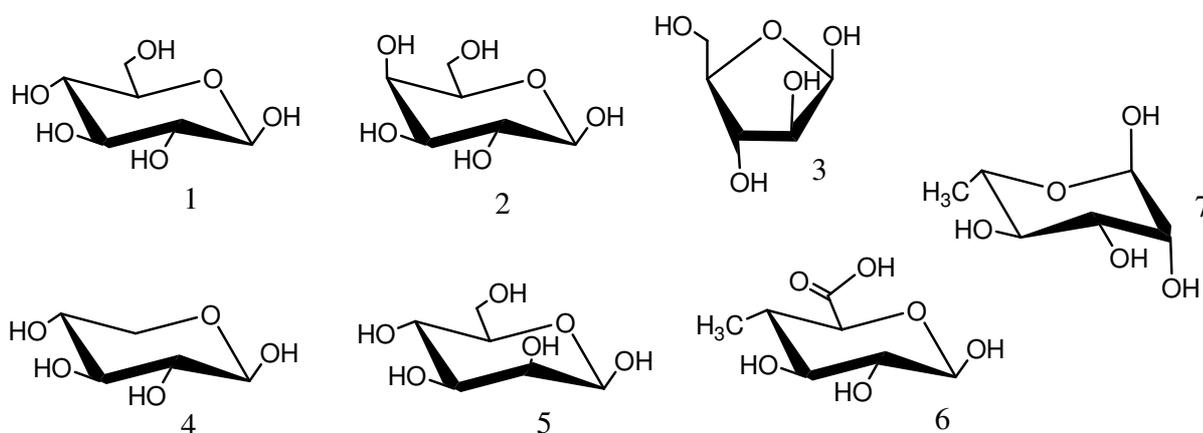
Fonte: MARTINS, 2005.

Alguns autores sugerem que a hidrólise enzimática é mais suscetível na celulose amorfa, visto que, a mesma apresenta uma maior área superficial. Todavia, vários microorganismos produzem diversos complexos enzimáticos que são capazes de catalisar a hidrólise da celulose cristalina e amorfa, em açúcares de baixa massa molar como a glicose e a celobiose (MARTINS, 2005).

### 2.3. HEMICELULOSE

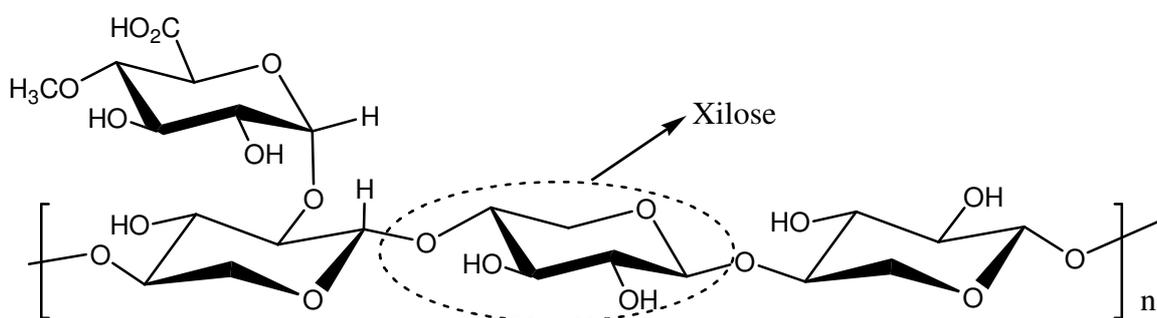
A hemicelulose é um heteropolissacarídeo constituído por uma variedade de monossacarídeos construtivos. Dentre eles estão: pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácidos 4-*O*-metil-glucurônico e galacturônico), suas estruturas podem ser observadas na figura 5a. São estruturalmente mais semelhantes à celulose do que à lignina, apresenta ramificações e cadeias laterais (Figura 5b) que interagem naturalmente com a celulose, permitindo estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003; SJÖSTRÖM, 1992; SANTOS et al., 2012).

Figura 5- Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. 5a-1) D-Glucose, 2) D-Galactose, 3) L-Arabinose, 4) D-Xilose, 5) D-Manose, 6) 4-*O*-metil-D-glucurônico, 7) L-Ramnose.



Fonte: SJÖSTRÖM, 1992.

Figura 5b- Representação esquemática da hemicelulose.



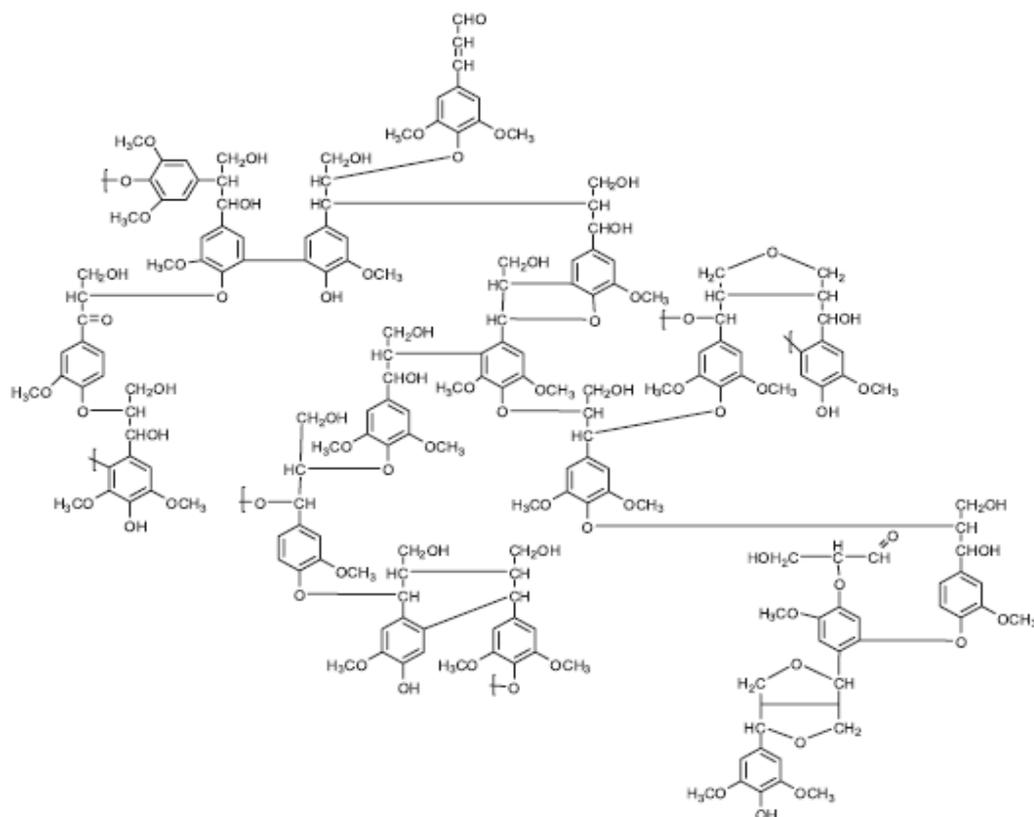
Fonte: SANTOS et al., 2012.

Devido ao caráter amorfo desses polissacarídeos as hemiceluloses apresentam uma maior reatividade quando comparadas com a celulose. Isso acontece, pois apresentam uma maior suscetibilidade à hidrólise ácida, visto que, oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais usualmente utilizados como catalisadores (FENGEL; WEGENER, 1989).

## 2.4. LIGNINA

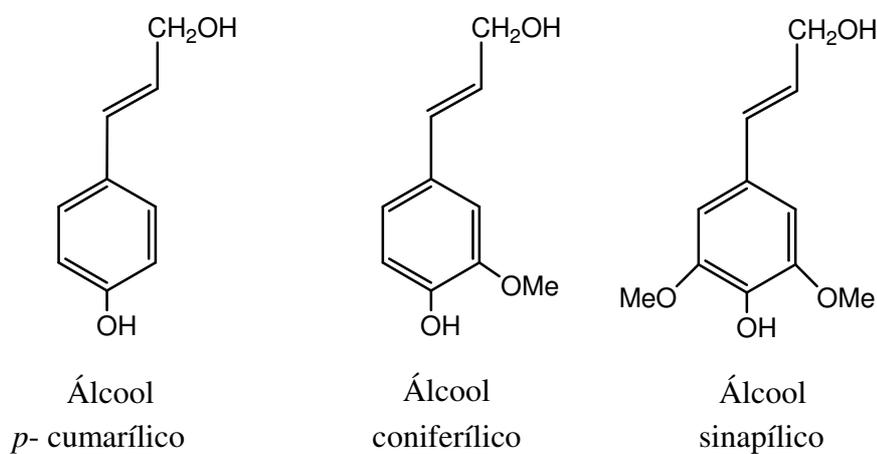
A lignina é um heteropolímero amorfo com estrutura tridimensional muito complexa (Figura 6) e é composta por três diferentes unidades precursoras de fenilpropanos: álcool p-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico (Figura 7). A estrutura da lignina é heterogênea, pois apresenta regiões amorfas e estruturas globulares. Sua composição e a ordenação de seus constituintes variam de uma espécie para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose (SJÖSTRÖM, 1992; LU et al., 2002, SANTOS et al., 2012).

Figura 6- Representação esquemática da lignina de eucalipto.



Fonte: SANTOS et al., 2012.

Figura 7- Estrutura dos alcoóis precusores da lignina.



Fonte: SJÖSTRÖM, 1992.

A lignificação é uma das etapas finais da diferenciação das células no xilema, onde a lignina é depositada juntamente com os carboidratos, formando ligações covalentes com unidades monossacarídicas das hemiceluloses (FENGEL; WEGENER, 1989). Segundo Martins (2005) a propriedade física mais relevante dessa macromolécula é a sua rigidez que evita o colapso de elementos condutores de água, além de, permitir estrutura ao tecido da planta. A lignina age na parede celular como material adesivo, como agente de enrijecimento e como barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana (FENGEL; WEGENER, 1989).

Como a lignina atua como uma barreira física no processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, as enzimas utilizadas nesse processo podem ser irreversivelmente capturadas por ela, o que pode influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise (LU et al., 2002).

## **2.5. EXTRATIVOS**

Os extrativos presentes na fitobiomassa são conceitualmente componentes que apresentam baixo peso molecular, compreendem uma gama de compostos orgânicos que não residem na parede celular, e sua presença relativa é determinada por diversos fatores, tais como: natureza genética e climática. São comumente solúveis em água e solventes orgânicos neutros ou volatilizados por arraste de vapor (MARTINS, 2005).

Também são encontrados os compostos menores que são considerados não-extraíveis, como por exemplo, compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécticas (RAMOS, 2003). Nas cinzas da planta os cátions potássio e cálcio correspondem cerca de 50% dos constituintes minerais, além dos íons

magnésio, manganês, sódio, fósforo e cloro assim como sílica (RAMOS, 2003; MONTE, 2009).

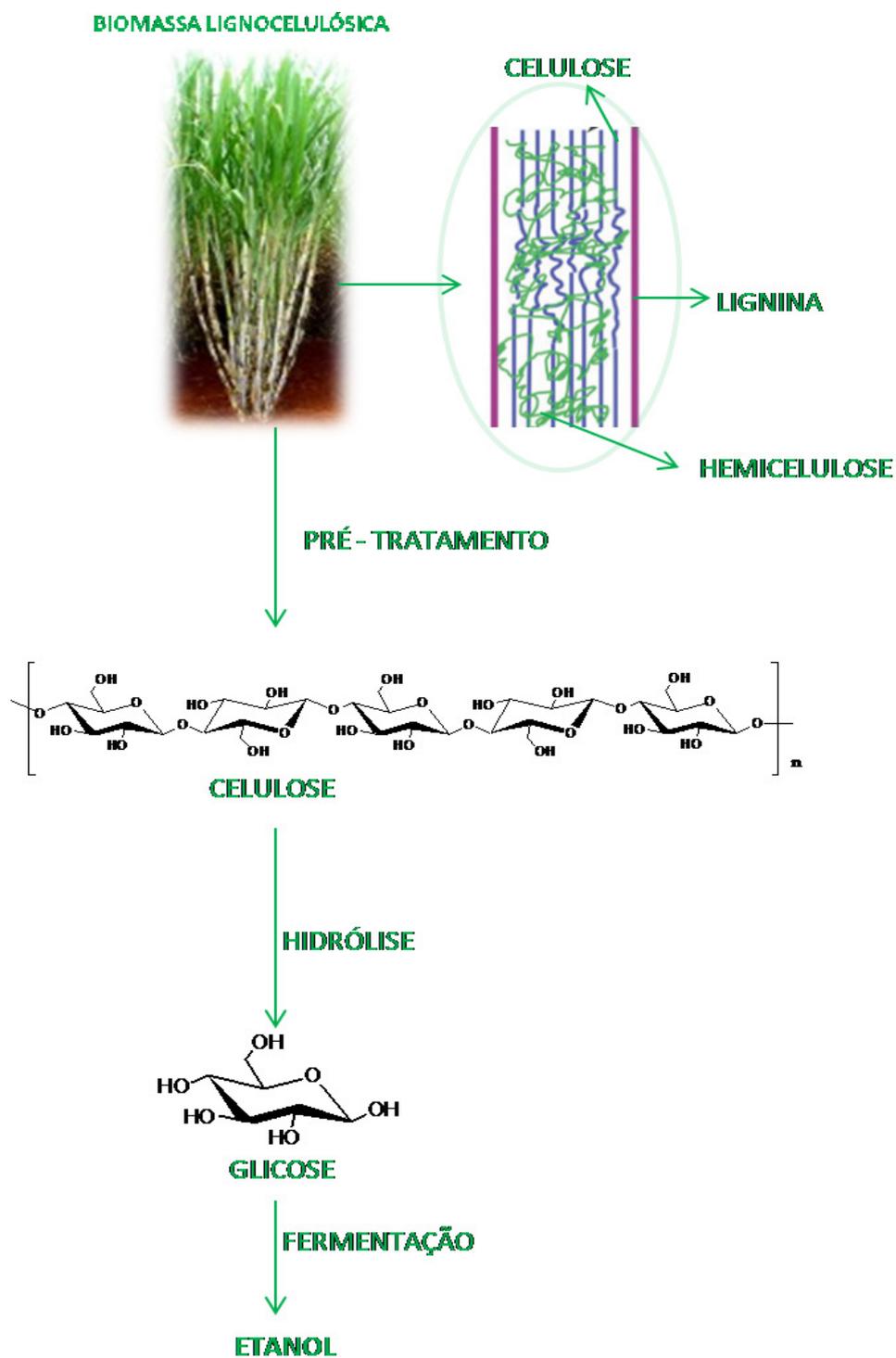
Segundo D’Almeida (1988) o teor de extrativos em folhosas corresponde em cerca de 3 a 10%, e para as coníferas em torno de 5 a 8%. Esses constituintes são responsáveis por certas características das plantas, tais como, a cor, o odor, a resistência natural ao apodrecimento, o sabor e suas propriedades abrasivas.

## **2.6. PRÉ-TRATAMENTOS DE LIGNOCELULÓSICOS**

A complexa estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica, que combina a presença de hemicelulose e lignina envolvendo as cadeias de celulose dificulta o acesso de reagentes e catalisadores, sendo necessário um tratamento prévio para a remoção destes componentes para facilitar o acesso das enzimas à celulose (SANTOS et al., 2012).

Visando a produção de etanol celulósico, várias etapas precisam ser seguidas para que se alcancem melhores rendimentos. As etapas se resumem ao pré-tratamento, hidrólise, fermentação e por fim a destilação que visa à separação de componentes da mistura de acordo com a volatilidade relativa dos componentes (Figura 8) (SANTOS et al., 2012).

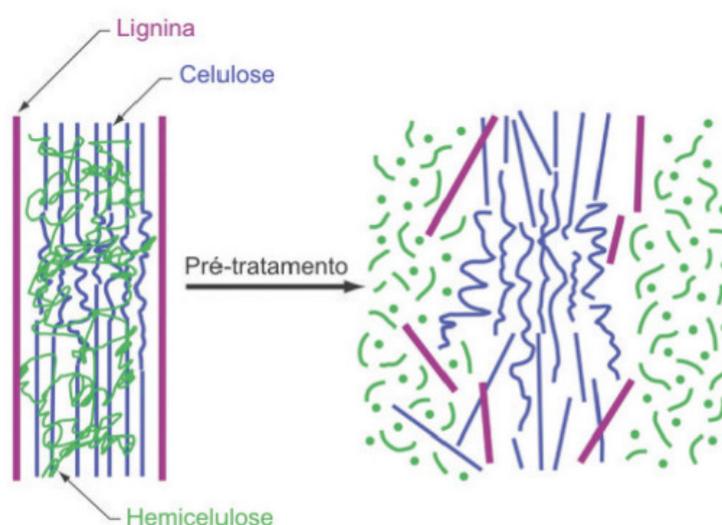
Figura 8- Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptada de SANTOS et al. ,2012 .

Devido à natureza recalcitrante da biomassa, a etapa de pré-tratamento se torna a mais importante em termos de custo direto, pois influencia diretamente os custos das etapas anteriores e subsequentes do processo. Conforme ilustrado na figura 9, o pré-tratamento tem por finalidade alterar ou remover a lignina e a hemicelulose, aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, o que acarreta em aumento na digestibilidade do complexo enzimático e, conseqüentemente, em elevados rendimentos de açúcares (MOSIER et al.,2005; WYMAN et al., 2005).

Figura 9- Representação esquemática das alterações do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento.



Fonte: FERRAZ, 2010.

Atualmente existe uma variedade de pré-tratamentos propostos e desenvolvidos. Esses métodos podem ser classificados de diferentes formas, pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos ou pode existir uma combinação destes na tentativa de minimizar a recalcitrância da fitobiomassa. Conforme o Quadro 1 Santos (2012) e colaboradores apresentaram uma revisão da literatura que abrange as vantagens e desvantagens dos vários métodos de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos.

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens de métodos de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos.

Pré-tratamento		Características composicionais			Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemicelulose	Lignina		
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução de cristalinidade	Alto consumo de energia
Químico	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, altas produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
	Hidróxido de sódio	Inchação significativa	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, >50%	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina
	ARP	Menor que 5% de despolimerização	~50% de solubilidade	~70% de solubilização	Efetiva deslignificação	Recuperação alcalina, relativamente caro
	Hidróxido de cálcio	Pouca despolimerização	Significativa solubilização	Solubilização parcial (~40%)	Efetiva remoção de lignina e acetil, baixo custo	Menor efetividade devido a pouca solubilidade da cal
	Ozonólise	Não foi observada despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização acima de 70%	Efetiva deslignificação em condições suaves	Caro, necessidade de mais ozônio
	Organosolv	Considerável inchação	Significativo, quase completa	Significativo, pode ser quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente cara
Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	~40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise
Combinado	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório
	AFEX	Diminuição do grau de cristalinidade	Acima de 60% de solubilidade	10-20% de solubilização	Menor perda de xilanas, não formação de inibidores	Recuperação de amônia, não é efetivo para alta concentração de lignina

Quadro 1- Vantagens e desvantagens de m Fonte: Santos et al., 2012.dos materiais lignocelulósicos

Dentre estes métodos, os pré-tratamentos químicos e combinados têm sido alvo de maior ênfase, pois permitem remover a lignina sem degradar a cadeia celulósica. Como a lignina está quimicamente ligada às hemiceluloses, uma degradação parcial das hemiceluloses ocorre no processo de pré-tratamento químico (SANTOS et al., 2012).

De acordo com Silva (2009) o pré-tratamento com ácido diluído e a deslignificação aumentam o tamanho dos poros e reduzem a cristalinidade da celulose, de forma a favorecer sua conversão enzimática. Tal fato é justificado pela redução da recalcitrância da biomassa lignocelulósica, devido à remoção da hemicelulose e lignina, as quais são estruturas amorfas com grau de polimerização bastante inferior ao da celulose.

Além disso, o pré-tratamento com ácido diluído tem a vantagem de solubilizar a hemicelulose e convertê-la em açúcares fermentescíveis, o que elimina ou reduz a necessidade de se utilizar hemicelulases nos complexos enzimáticos durante a etapa de hidrólise enzimática (SANTOS et al., 2012).

## **2.7. CELULASES**

Celulases são enzimas que constituem um complexo enzimático capaz de hidrolisar o material lignocelulósico. Essas enzimas são biocatalisadores que atuam em sinergia para a disponibilização de açúcares, dentre os principais podemos citar a glicose que desperta grande interesse por apresentar a possibilidade de conversão em etanol (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996).

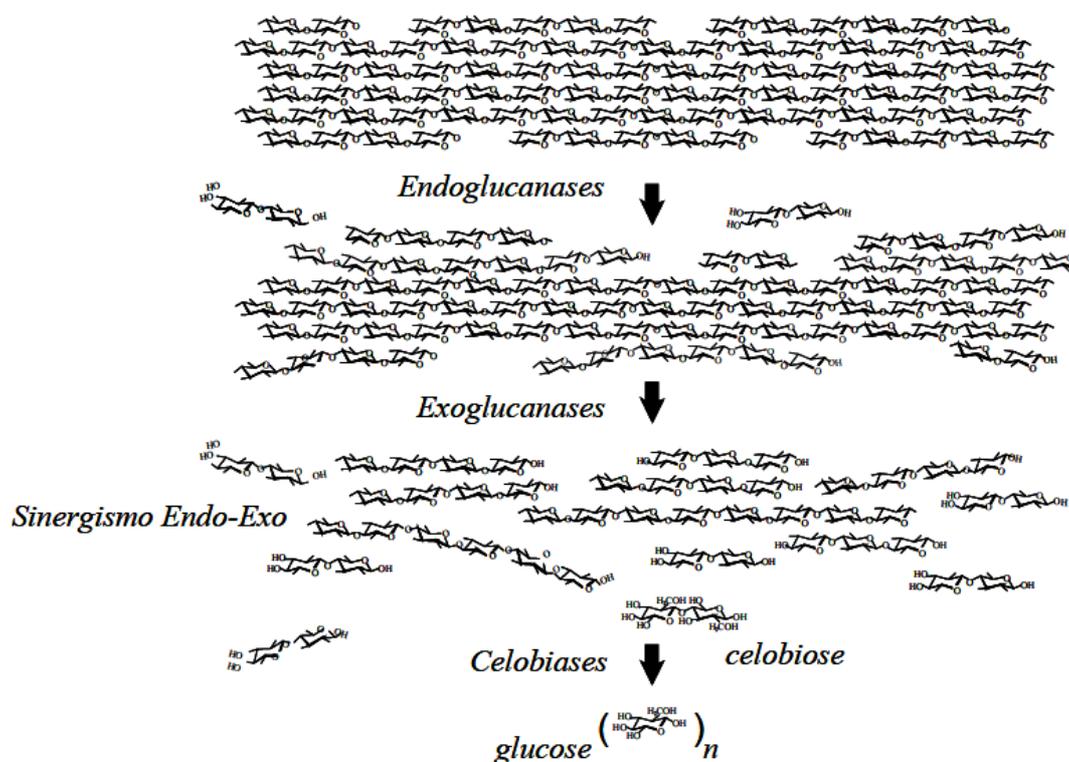
Essas enzimas começaram a ser estudadas durante a Segunda Guerra Mundial, onde os soldados das forças armadas norte-americanas perceberam a deterioração das fardas, barracas, bolsas e demais objetos do acampamento que eram constituídos de algodão (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). Juntamente com

as forças armadas algumas organizações, como a *Quartermaster Corps*, iniciaram as pesquisas para explicar e trazer soluções imediatas para o problema. Para isso, as pesquisas estavam voltadas para a detecção de organismos agentes das deteriorações, seus mecanismos de ação e métodos de controle. O grupo de trabalho liderado pelo Dr. Elwyn T. Reese obteve como resultado das pesquisas, uma linhagem, codificada como QM6a, de um fungo filamentoso, identificado posteriormente como *Trichoderma viride*, foi isolada e a esta foi atribuída a característica de excretar enzimas capazes de degradar celulose, nomeadas celulases (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Desde então, observa-se um crescente interesse em estudos sobre as enzimas do complexo celulolítico. O início do século XXI foi marcado por grandes investimentos na produção de celulases, especialmente focada para sua aplicação na obtenção de etanol celulósico (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Esse complexo enzimático é composto por três classes principais de enzimas que atuam em conjunto para hidrolisar a celulose à glicose. As enzimas que compõe o complexo são as endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; exoglucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose; e 1,4- $\beta$ -D-glucosidases que hidrolisam a celobiose à glicose. A figura 10 mostra a atuação sinérgica do complexo enzimático na degradação da celulose (WOOD, 1989).

Figura 10- Modo de ação de celulasas sobre a celulose.



Fonte: MARTINS, 2005.

Em meados da década de 80 foi iniciada a produção de celulasas em escala industrial visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

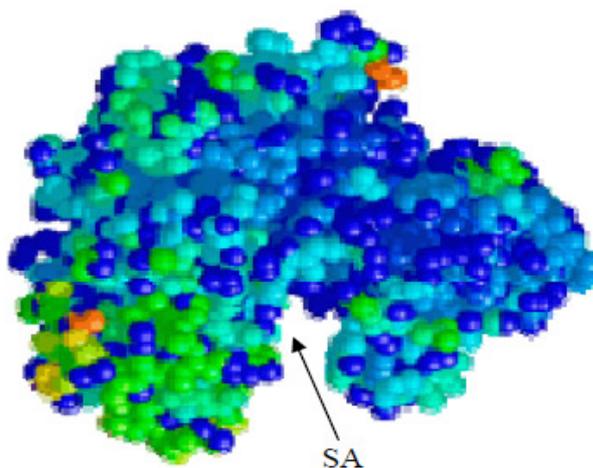
Na indústria de alimentos as celulasas são utilizadas como um insumo para melhorar propriedades sensoriais de massas, atuam no processamento de bebidas promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Na indústria têxtil são utilizadas nos processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamiento e desbotamento do brim) (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

## 2.8. ENDOGLUCANASES

Endoglucanase que possui como nome sistemático, segundo a IUBMB – (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) 1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucano-hidrolase, é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise e também pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do GP), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos. Tal enzima hidrolisa de forma aleatória as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Segundo Martins (2005), as endoglucanases possuem seu sítio ativo no formato de uma chave, o que permite a ação da enzima ao longo da cadeia celulósica reduzindo consideravelmente seu GP (Figura 11). As regiões amorfas da celulose estão mais suscetíveis a esse ataque enzimático, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações intermoleculares por ligações de hidrogênio tão fortes quanto à celulose cristalina.

Figura 11- Representação do sítio ativo (SA) das endoglucanases em forma de chave.



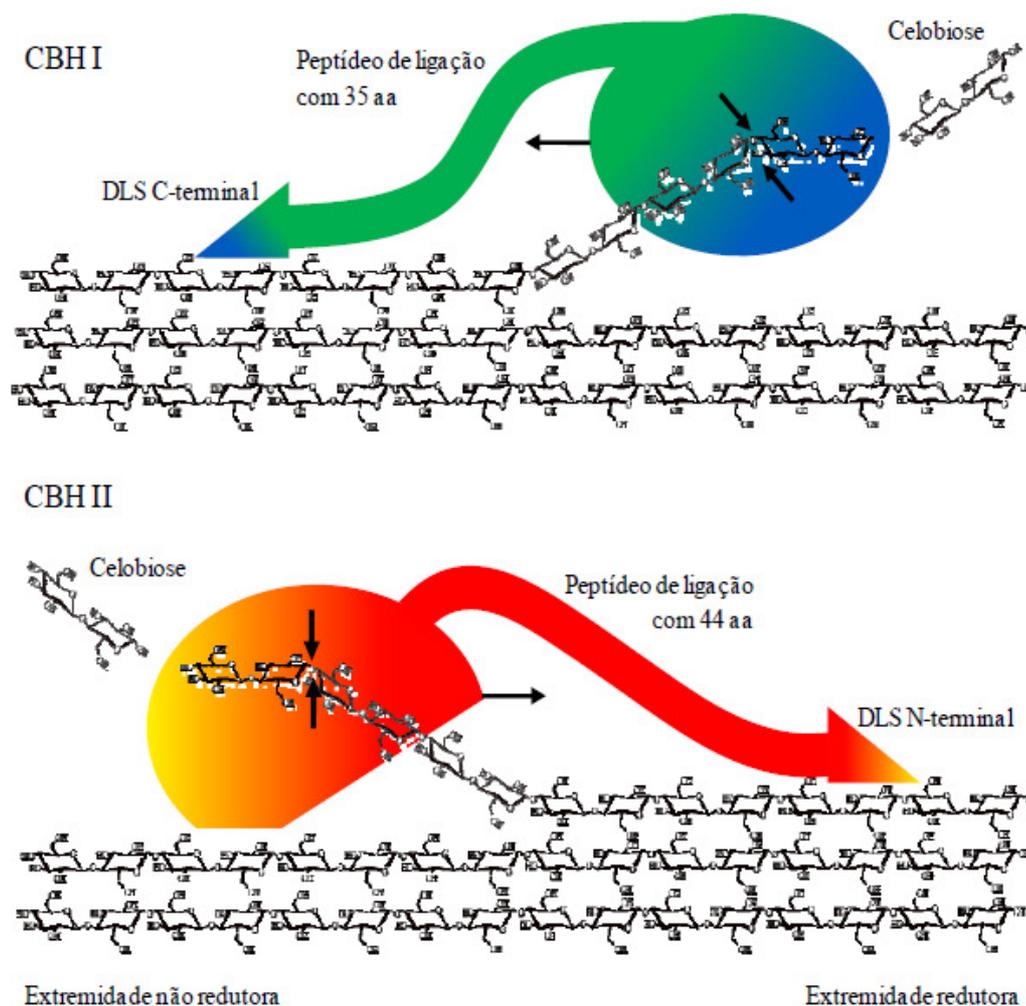
Fonte: MARTINS, 2005.

## 2.9. EXOGLUCANASES

As exoglucanases atuam sobre a celulose cristalina produzindo uma diminuição lenta e gradual do seu grau de polimerização. O grupo das exoglucanases é constituído por celobio-hidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH), cujo nome sistemático é 1,4-b-D-glucana-glucano-hidrolase E 1,4-b-D-glucana-celobio-hidrolase respectivamente. A GH é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrolisar a fibra celulósica liberando glicose diretamente do polímero. As CBH atuam nas extremidades reductoras e não reductoras da celulose liberando como produto principal a celobiose, além de glucose e celotriose (CASTRO & PEREIRA JR, 2010; MARTINS, 2005).

As CBH podem ser divididas em tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores (R), e tipo II (CBH II) que hidrolisa terminais não redutores (NR). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) conforme indicado na figura 12 (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Figura 12- Representação do modo de ação da celobio-hidrolase I (CBH I) e celobio-hidrolase II (CBH II).



Fonte: MONTE, 2009.

## 2.10. $\beta$ -GLICOSIDASES

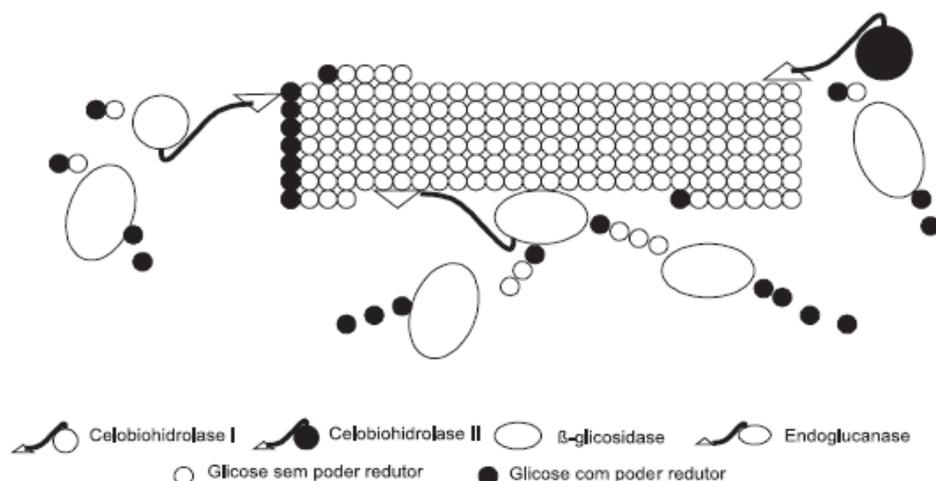
A  $\beta$ -glicosidase que tem como nome sistemático  $\beta$ -glicosídeo glucohidrolase possui a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glicose. Assim como a CBH, também é reportada com a

característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise (LYND, et al., 2002).

O trabalho sinérgico das enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases: 1) sinergia EnG-ExG - a endoglucanase, atua na região amorfa da fibra de celulose, disponibilizando terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente; 2) sinergia ExG-ExG - as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase; 3) sinergias ExG-BG e EnG-BG - como seus produtos de hidrólise, a celobio-hidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a  $\beta$ -glicosidase que obtém como produto final a glicose (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

A Figura 13 ilustra a ação sinérgica entre exoglucanases, endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica.

Figura 13- Representação do modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.



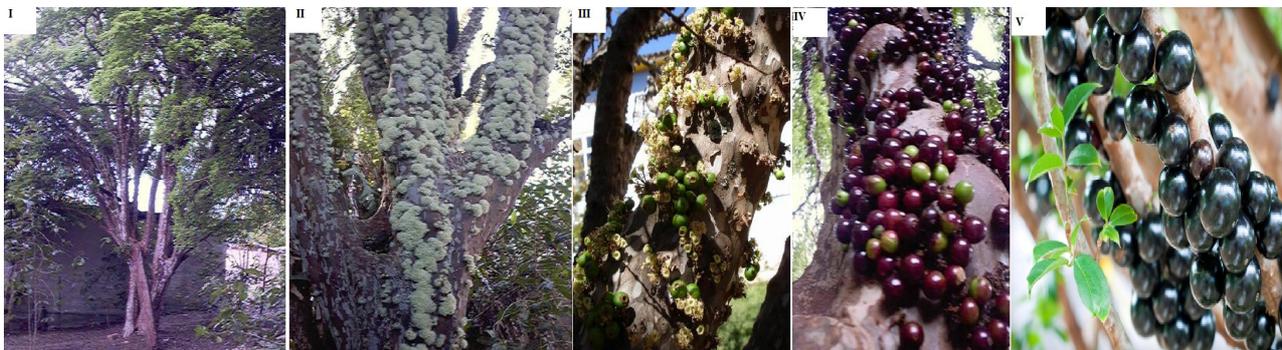
Fonte: CASTRO; PEREIRA JR, 2010.

## 2.11. JABUTICABA

A jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg) é uma árvore nativa do Brasil pertencente à família Myrtaceae, e pode ser encontrada em vários locais do país de forma espontânea. Dentre as espécies mais disseminadas a principal é a *M. cauliflora*, sendo as principais variedades a jabuticaba Sabará *Myrciaria jabuticaba* (Vell) Berg e a jabuticaba Paulista *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg (LIMA et al., 2008).

Sua árvore apresenta tamanho médio, grande rusticidade, longevidade e é altamente produtiva. Suas folhas são do tipo opostas, lanceoladas, suas flores são brancas e seus frutos surgem durante a primavera crescendo diretamente do seu tronco e ramos. No processo de amadurecimento os frutos apresentam inicialmente coloração verde da casca, que se torna vermelha e adquirem coloração negra quando estão completamente maduros (ASCHERI, 2006; GOMES, 1987). Na figura 14 podemos observar uma jabuticabeira adulta com suas flores e frutos.

Figura 14- I-Jabuticabeira adulta. II- Flores brancas da jabuticabeira. III- Jabuticaba verde. IV- Jabuticaba vermelha (processo de amadurecimento). V- Jabuticaba negra (madura).



Fonte: [www.jabuticabeiras.blogspot.com.br](http://www.jabuticabeiras.blogspot.com.br) acesso em: 27/07/2016.

A jabuticaba é uma fruta do tipo baga, globosa, pode chegar a tamanhos de 3 a 4 cm dependendo da espécie. Conforme pode ser observado na figura 15, a casca envolve uma polpa succulenta, macia, esbranquiçada possuindo de 1 a 4 sementes, e possui um sabor sub-ácido (POPENOE, 1974). Os frutos possuem um pequeno período de comercialização após a colheita, pois são altamente perecíveis. Isso ocorre devido à rápida alteração da aparência decorrente da intensa perda de umidade, deterioração e fermentação da polpa, observadas em apenas dois a três dias após a colheita (CORRÊA et al., 2007).

Figura 15- Partes da jabuticaba.



Fonte: [www.jabuticabeiras.blogspot.com.br](http://www.jabuticabeiras.blogspot.com.br) acesso em: 27/07/2016.

Além do seu consumo *in natura* a jabuticaba também é utilizada na preparação de licores, geléias, vinhos e vinagres. Durante a produção desses subprodutos é descartado, normalmente, a casca e as sementes, o que somaria em torno de 50% da fruta, por esse motivo vêm se buscando alternativas para um melhor aproveitamento dos resíduos das produções de artefatos que têm como matéria-prima principal a jabuticaba (BRUNINI et al., 2004; PEREIRA et al., 2000; POPENOE, 1974).

Com a finalidade de minimizar perdas econômicas significativas, ASQUIERI et al. (2004), produziram “vinho” branco, utilizando a polpa, e “vinho” tinto, utilizando a casca do fruto. Com o intuito de aproveitar o bagaço obtido da prensagem das massas “vínicas”, da indústria de “vinhos” de jabuticaba, ASCHERI et al. (2006) produziram farinhas pré-gelatinizadas misturando o bagaço à farinha de arroz polido usando um processo de extrusão termoplástica.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o pré-tratamento ácido na casca de jabuticaba é eficiente para uma melhor disponibilização da celulose à ação das enzimas celulasas e  $\beta$ -glicosidades.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar a caracterização físico-química da casca de jabuticaba.
- Comparar os resultados do ataque enzimático da biomassa lignocelulósica (casca de jabuticaba) com pré-tratamento ácido e sem tratamento, para avaliar qual apresenta melhores resultados de disponibilização da celulose.
- Caracterizar o material antes e após o pré-tratamento através de MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) e ATG (Análise Termogravimétrica).
- Verificar o tipo de açúcares liberados após o ataque enzimático de celulasas e  $\beta$ -glicosidades na casca de jabuticaba através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Avaliar se os açúcares disponibilizados a partir do bagaço da casca de jabuticaba possuem a capacidade de fermentação a etanol celulósico;

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

A caracterização Físico-química e o pré-tratamento ácido foram realizados nos laboratórios de análise instrumental e química geral da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

A etapa de hidrólise enzimática foi realizada no laboratório de enzimologia da Universidade Federal de Goiás (UFG).

A determinação da concentração de açúcares foi obtida no laboratório de biotecnologia molecular da Faculdade de medicina da USP de Ribeirão Preto.

Os termogramas da análise termogravimétrica foram realizados no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

### **4.1. REAGENTES**

A celulase e  $\beta$ -glicosidase comercial (Sigma) e outros reagentes e solventes utilizados são de grau analítico, e não sofreram nenhuma etapa prévia de purificação.

### **4.2. MATÉRIA-PRIMA**

A jabuticaba sabará utilizada para o presente estudo foi obtida através do comércio local do município de Teresópolis-GO, Latitude: -16.4735, Longitude: -49.0797, 16° 28' 25" Sul, 49° 4' 47" Oeste. Os frutos foram lavados abundantemente em água de torneira sendo as sementes separadas das cascas, afim de, retirar impurezas e resíduos provenientes da polpa e das cascas. Logo

após, as cascas foram submersas em água destilada por 1 h e secas em estufa por 24 h a 60 °C. Após esse procedimento as cascas foram pesadas e divididas em 2 partes iguais de 33,30g. Uma das partes foi utilizada para a etapa de pré-tratamento e a outra parte foi triturada em moinho de facas Manesco e Ranieri Ltda, tipo MR 340 a 60 mesh e utilizada diretamente para a etapa de hidrólise enzimática.

### **4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

#### **4.3.1. Determinação de umidade**

O teor de umidade da casca de jaboticaba foi determinado pela secagem em estufa a 105°C, segundo método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz, 2008. Em um cadinho de porcelana previamente padronizado em estufa a 105°C por 60 minutos, foi pesado 2 g de amostra e foi levado à estufa a 105° C por 4 horas. Após esse período na estufa, onde obteve-se peso constante, a amostra foi resfriada em dessecador e pesada novamente. O teor de umidade foi calculado por:

$$\frac{100 \times \text{massa em g de umidade}}{\text{massa em g de amostra}} \quad (4.1)$$

#### **4.3.2. Determinação de cinzas**

Para o teor de cinzas foi pesado 2,0g de amostra em cadinho de porcelana, previamente padronizado em mufla a 550°C por 20 minutos. A amostra foi carbonizada lentamente no bico de bunsen dentro da capela, procurando aquecer igualmente todas as faces do cadinho. Em seguida, o cadinho foi transferido com

o auxílio de uma pinça para a mufla a 550°C por 4 horas para a total destruição da matéria orgânica. O teor de cinzas foi calculado por:

$$\frac{100 \times \text{massa em g de cinzas}}{\text{massa em g de amostra}} \quad (4.2)$$

### 4.3.3. Determinação de carboidratos

O método utilizado para a determinação de carboidratos foi o método colorimétrico fenol-sulfúrico conforme metodologia proposta por DUBOIS et al. (1956), onde os teores de açúcares totais são determinados por espectrofotometria a 490 nm utilizando-se uma curva padrão de glicose (1%) de intervalo de 10 a 90 µg.

Para a preparação da amostra foi pesado 0,02g de casca de jabuticaba seca e finamente moída a 60 mesh, que foram transferidas para um balão volumétrico de 250 mL, retirando alíquotas de 0,2-0,5-0,8-1,0-1,2-1,5 mL em tubos enumerados, colocando em cada tubo 1,8-1,5-1,2-1,0-0,8-0,5 mL de água destilada, respectivamente. Foi acrescentado 0,8 mL de fenol 5% e adicionado rapidamente 5,0 mL de ácido sulfúrico 95%, os tubos foram agitados e resfriados em banho de água/gelo. As amostras ficaram em repouso por 30 minutos para realizar a leitura das absorvâncias a 490 nm em espectrofotômetro.

### 4.3.4. Determinação de proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método micro Kjeldahl, para isso, foram pesados em papel vegetal na balança analítica com quatro casas decimais, 0,5 g da casca de jabuticaba, previamente moídas a 60 mesh, em triplicata. As amostras foram transferidas para os tubos de Kjeldahl, adicionado 2,5 g de uma mistura catalítica (sulfato de cobre + sulfato de sódio (1:10) ) e 4,0 mL de ácido

sulfúrico P.A. Os tubos foram levados ao bloco digestor e foram mantidos a temperatura a 50°C por 1 hora, a temperatura foi elevada gradativamente até atingir a 400°C, até que o líquido ficasse com a tonalidade azul esverdeada. Quando a coloração desejada foi atingida os tubos foram retirados do aquecimento e resfriados à temperatura ambiente, logo após foi adicionado 10,0 mL de água destilada.

Foi acoplado ao destilador de nitrogênio aos erlenmeyers contendo 20,0 mL de ácido bórico a 4% com 5,0 gotas da solução do indicador misto (70,0 mL de azul de metileno + 10,0 mL de vermelho de metila). Em seguida, foi acoplado o tubo Kjeldahl ao destilador e foi adicionado uma solução de NaOH a 50% até que a mesma se tornar-se negra e que obtivesse 120,0 mL de destilado nos erlenmeyers, logo em seguida foi feita a destilação com ácido clorídrico 0,1M.

#### **4.3.5. Determinação de Lipídios Totais**

O teor de lipídios totais foi realizado pelo método de Bligh e Dyer, foi pesado em tubos de 70 mL, 30g da casca de jabuticaba, previamente moídas em moinho de facas (Manesco e Ranieri Ltda, tipo MR 340) a 60 mesh, foi adicionado 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. As amostras foram agitadas no agitador rotativo por 30 minutos, logo após foi adicionado exatamente mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL da solução de sulfato de sódio 1,5%, e agitou-se vigorosamente por 2 minutos. As amostras ficaram em repouso por 1 hora e 30 minutos para separarem as fases. Seccionou e foi descartada a camada metanólica superior. Foi adicionado em papel de filtro 1,0 g de sulfato de sódio P.A e a camada inferior foi filtrada em uma proveta, pegando 5 mL da amostra e transferida para cadinhos em triplicata, que haviam sido secos em estufa a 105°C por 30 minutos. Após a transferência dos 5 mL de

amostra as mesmas foram levadas à estufa a 105°C por 45 minutos, após esse período as amostras foram retiradas e armazenadas em dessecador para que atingissem a temperatura ambiente (25°C) e foram pesadas em balança analítica de 4 casas decimais.

#### 4.3.6. Determinação de Holocelulose

O teor de holocelulose foi determinado conforme metodologia proposta por Browing (1963). Inicialmente 3 g do material previamente seco a 105 °C foi colocado em um Erlenmeyer de 250 mL juntamente com 120 mL de água destilada, 1 mL de ácido acético glacial e 2,5 g de clorito de sódio. O Erlenmeyer foi colocado em um banho termostaticado tipo Dubnoff (Marconi, MA-035), a 70 ± 2 °C sob agitação constante. A cada 60 minutos repetiu-se a adição de clorito de sódio e ácido acético, totalizando 3 vezes. A mistura foi resfriada até 5 °C e filtrada em cadinho de vidro com placa porosa previamente tarado. O material resultante foi lavado exaustivamente com água destilada 25°C até que o filtrado estivesse incolor e com pH neutro. O resíduo foi lavado com metanol e, em seguida, seco em estufa a 105 ± 5 °C, até peso constante. O teor de holocelulose foi determinado utilizando-se a Equação 4.3:

$$\text{Holocelulose}(\%) = \frac{\text{Massa de holocelulose (g)}}{\text{massa de amostra inicial (g)}} \times 100 \quad (4.3)$$

#### 4.3.7. Determinação de Celulose

O teor de celulose foi determinado conforme metodologia proposta por Saad et al. (1988). A um erlenmeyer de 100 mL foram adicionados cerca de 4 g de holocelulose seca obtida no item 4.3.6 e 60 mL de solução de KOH 24% (m/v). A mistura foi mantida sob agitação magnética por 15 horas à temperatura ambiente e, em seguida, filtrada em cadinho de vidro com placa porosa

previamente tarado. O resíduo sólido resultante foi lavado com duas porções de ácido acético 1% e água destilada até a neutralidade do filtrado e, por último, com etanol. A celulose foi seca em estufa a 105 °C, até peso constante. O teor de celulose foi calculado através da Equação 4.4:

$$\text{Celulose (\%)} = \frac{\text{massa de celulose (g)}}{\text{massa de amostra inicial (g)}} \times 100 \quad (4.4)$$

#### 4.3.8. Determinação do teor de Lignina solúvel e insolúvel

O teor de lignina foi calculado através da soma dos teores de Lignina Klason (TAPPI T222 om-11).

O teor de lignina Klason insolúvel foi determinado conforme procedimento da Technical Association of the Pulp and Paper Industry, TAPPI T222 om-11 (TAPPI, 2011). Inicialmente 1 g de amostra foi transferido para erlenmeyer de 50 mL e foram adicionados 15 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v) deixando o material sob agitação magnética por duas horas.

Após esse tempo a amostra foi transferida para balão de 1 L de fundo chato e adicionou-se 550 mL de água destilada mantendo a mistura em refluxo por 4 horas. Posteriormente, a mistura foi filtrada em cadinho de vidro com placa porosa previamente tarado. O material sólido foi lavado com água destilada até que o volume final do filtrado fosse próximo a 1 L. Em seguida, o cadinho com resíduo foi seco em estufa a 105 °C, até peso constante. O conteúdo de lignina insolúvel foi determinado pela Equação 4.5.

$$\% \text{ Lignina insolúvel} = \frac{\text{massa de resíduo (g)}}{\text{massa da amostra em base seca (g)}} \times 100 \quad (4.5)$$

Devido à presença de anéis aromáticos nas moléculas de lignina, a técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta é bastante adequada na determinação de lignina solúvel. Sendo assim, a concentração de lignina solúvel foi determinada com a utilização do filtrado da hidrólise ácida obtido no método Klason, o qual foi analisado através de espectroscopia na região do ultravioleta. Foram medidas absorvâncias a 215 e 280nm, tomando como branco a solução de ácido sulfúrico diluído nas mesmas proporções. A concentração de lignina solúvel foi calculada por meio da equação 4.6 abaixo:

$$\text{Lignina solúvel} = \frac{(4,53 \times A_{215}) - A_{280}}{300} \quad (4.6)$$

No qual a concentração de lignina solúvel na amostra é dada por ( $\text{g.L}^{-1}$ ),  $A_{215}$  e  $A_{280}$  são os valores obtidos para as absorvâncias nos comprimentos de onda de 215 e 280nm, respectivamente. Os produtos resultantes da degradação da celulose e polioses presentes na solução podem também absorver nesta região do espectro. A equação (4.6) considera a relação entre os valores de absorvidade destes produtos e os de lignina, conforme as equações (4.7) e (4.8)

$$A_{280} = 0,68 \text{ CD} + 18 \text{ CL} \quad (4.7)$$

$$A_{215} = 0,15 \text{ CD} + 70 \text{ CL} \quad (4.8)$$

Onde: CD = concentração dos carboidratos em  $\text{g L}^{-1}$  e CL = concentração de lignina solúvel em  $\text{g L}^{-1}$ . A concentração de lignina solúvel, em  $\text{g L}^{-1}$  foi convertida para porcentagem em peso, considerando a massa inicial de amostra. Posteriormente, calculou-se a porcentagem de lignina total, somando-se as frações de lignina Klason insolúvel e solúvel.

#### 4.4. PRÉ-TRATAMENTO

O pré-tratamento foi realizado com ácido sulfúrico 1% (m/v). Em um frasco colocou-se as cascas e a solução de ácido sulfúrico (1% m/v) e foi autoclavado a 121°C por 1 hora.

Após a retirada da autoclave o produto foi reservado até atingir a temperatura ambiente (25°C) e foi filtrado em papel de filtro. A filtração foi feita com lavagens de 100 ml de água destilada (25°C), esse procedimento foi repetido por 3 vezes. As cascas foram recolhidas e secas em estufa a 60°C por 48 horas. Depois de secas foram trituradas em moinho de facas (Manesco e Ranieri Ltda, tipo MR 340) a 60 mesh e armazenadas em saco nasco.

#### 4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As cascas trituradas antes e após o pré-tratamento foram fixadas em solução à base de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 mol L<sup>-1</sup> pH 7,2 por 12 horas a 4° C. Após a fixação o material sofreu quatro lavagens em tampão cacodilato 0,05 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,2 e foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio e tampão cacodilato em uma proporção 1:1 por 1 hora. Todas as amostras foram envolvidas em papel alumínio para que ficassem ao abrigo da luz. Posteriormente, o material sofreu uma série de quatro lavagens com tampão cacodilato 0,05 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,2 e, em seguida foi desidratado em série aquosa de acetona a concentração de 30, 50, 70, 85, 95 e 100%. O material permaneceu por 15 minutos em cada uma das concentrações, sendo que para a concentração final de 100% o material recebeu duas lavagens de 10 minutos cada. Logo após a desidratação foi feita a secagem ao ponto crítico, com a utilização do equipamento de secagem ao ponto crítico Balzers

CPD 030 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein). Em seguida o material foi vaporizado com ouro, durante 150 segundos, para isso, utilizou-se o “Sputter Coater” Balzers SCD 50 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein), e completou-se assim o preparo do material para observação ao MEV. As eletromicrografias foram realizadas no LabMic/UFG com o microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol, modelo JSM-6610 (Jeol Ltda, Tóquio, Japão).

#### **4.6. HIDRÓLISE DA BIOMASSA DE JABUTICABA**

Em um microtubos de 2 mL foram adicionados 0,01 g de casca de jabuticaba moída sem pré-tratamento e em outros tubos foram adicionados a jabuticaba moída que sofreu o pré-tratamento químico com ácido sulfúrico 1% (m/v). Foi adicionado aos tubos 1mL de tampão citrato fosfato 50 mMol L<sup>-1</sup> pH 4,8 contendo as quantidades de 20U/10U de celulase e β-glicosidase respectivamente. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 50°C e velocidade de 200 rpm por 24, 48,72 ,96 e 120 horas. Após esse período as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para dosagens de açúcares por CLAE.

#### **4.7. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES**

As concentrações de cellopentose, cellotriose, glicose, galactose, arabinose, xilitol, celobiose, gentiobiose, sofrorse, ácido acético, ácido glucorônico, presentes no hidrolisado foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a injeção no CLAE as amostras foram filtradas em filtro Millex 0,22. As condições cromatográficas foram: coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura: 45 °C; eluente: ácido sulfúrico

0,01N; fluxo: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra: 20 µl; detector: índice de refração.

#### **4.8. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA**

Os termogramas foram obtidos pela técnica de análise térmica diferencial e termogravimétrica, usando um equipamento (Shimadzu DTG-60H). As medidas foram realizadas no intervalo de temperaturas de 25 a 800 °C, e a taxa de aquecimento utilizada foi de 5 °C/min, fluxo de ar sintético de 50 mL/min e cadinhos de platina de 70 µl.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização físico-química da casca da jabuticaba possibilitou determinar os valores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e açúcares totais. O quadro 2 aponta os resultados obtidos em gramas para 100g de bagaço seco da casca de jabuticaba.

Quadro 2 - Avaliação das características físicas e químicas da casca de Jabuticaba

Base seca (g/100g)				
Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídeos	Carboidratos
79,61 ± 0,690	0,593 ± 0,032	9,82 ± 0,120	1,97 ± 0,113	66,85 ± 0,974

Realizando uma relação com os resultados obtidos por ASQUIERI et al. (2004) que determinou propriedades físico-químicas em frutos de jabuticaba "sabará" no qual obtiveram respectivamente teores de umidade, lipídios e proteínas de 83,3, 2,1 e 1,0 g em 100 g de polpa de jabuticaba e teores de açúcares totais, redutores e não redutores respectivamente de 11,2, 9,3 e 1,9 g, apresentando valores de umidade e lipídios maiores, tendo o valor de proteínas muito abaixo o deste trabalho. Já o trabalho de ASCHERI et al. (2006) que determinou os valores de umidade, cinzas e proteína no "bagaço fresco" de jabuticaba apresentou resultados de 7,32, 1,35 e 4,17 g por 100g, respectivamente, em contraste com o deste trabalho apresentou o valor de umidade bem abaixo o deste trabalho (79,61g) em matéria seca, apresentando o valor de cinzas acima e o valor de proteínas muito abaixo o aqui apresentado.

No quadro 3 está apresentado a composição centesimal da casca de manga, jambo, abacate, abacaxi, banana, mamã, maracujá, melão e tangerina.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho para a casca de jabuticaba com as demais frutas, pode-se verificar que o valor de proteína e açúcares totais da jabuticaba foram os mais expressivos entre todas. Para o teor de cinzas a casca de jambo apresentou um valor bem mais elevado do que as demais. Em contrapartida a casca de abacate apresentou um alto teor de lipídeos e os valores obtidos para umidade mostraram uma coerência entre si, com resultados bem próximos, com exceção da casca de jambo que apresentou resultado muito inferior as demais.

Quadro 3- Composição centesimal da casca de frutas (g/100g).

Fruta	g/100g de amostra das cascas de frutas				
	Proteína	Lipídeos	Umidade	Açúcares totais	Cinzas
Jabuticaba	9,82	1,97	79,61	66,85	0,593
Manga <sup>1</sup>	1,24 ± 0,11	0,18 ± 0,01	78,7 ± 0,45	2,24 ± 0,06	*
Jambo <sup>2</sup>	8,62 ± 0,23	4,51 ± 0,10	14,11 ± 0,4	3,04 ± 0,4	4,17 ± 0,35
Abacate <sup>3</sup>	1,51	11,04	76,95	*	0,75
Abacaxi <sup>3</sup>	1,45	0,55	78,13	*	1,03
Banana <sup>3</sup>	1,69	0,99	89,47	*	0,95
Mamão <sup>3</sup>	1,56	0,08	90,63	*	0,82
Maracujá <sup>3</sup>	0,67	0,01	87,64	*	0,57
Melão <sup>3</sup>	1,24	0,1	93,23	*	0,96
Tangerina <sup>3</sup>	2,49	0,64	49,1	*	1,75

Fonte: 1- MARQUES et al. 2010; 2- AUGUSTA et al. 2010; 3- GONDIM et al. 2010

\* dados não fornecidos

Diariamente é comum observar o descarte das cascas de frutas, seja no seu consumo *in natura* ou na fabricação de subprodutos. Um exemplo disso é o descarte das cascas e sementes da jabuticaba para a preparação de licores, geléias, vinhos e vinagres o que soma em torno de 50% da fruta. As análises químicas mostraram que as cascas das frutas apresentam, em geral, teores de nutrientes próximos ou até maiores do que os das suas respectivas partes

comestíveis. Desta forma, as cascas das frutas aqui consideradas, podem servir como fonte alternativa de nutrientes, evitando o desperdício de alimentos, além de aumentar o valor agregado das mesmas.

Como a casca de jabuticaba é considerada uma matéria-prima lignocelulósica fez-se necessário a determinação dos teores de celulose, holocelulose (celulose + hemicelulose), lignina e hemicelulose, para um melhor conhecimento das características da mesma. Os dados obtidos em porcentagem podem ser verificados no quadro 4.

Quadro 4 - Composição das principais estruturas na casca de jabuticaba.

Celulose (%)	Holocelulose (%)	Lignina (%)	Hemicelulose (%)
20,63	41,34	24,33	13,69

No quadro 5 podemos comparar os resultados obtidos no presente trabalho da composição da casca de jabuticaba com alguns resíduos lignocelulósicos disponíveis na literatura.

Quadro 5 - Composição química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos.

Resíduo	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Casca de jabuticaba	20,63	13,69	24,33
Farelo de cevada <sup>1</sup>	23,0	32,7	24,4
Sabugo de milho <sup>1</sup>	31,7	34,7	20,3
Folhas de milho <sup>1</sup>	37,6	34,5	12,6
<i>Eucalyptus globulus</i> <sup>1</sup>	46,3	17,1	22,9
Bagaço de cana <sup>2</sup>	35,0	25,0	23,0
Palha de trigo <sup>3</sup>	33,81	31,83	20,12
Casca de aveia <sup>4</sup>	29,26	28,35	22,22

Fonte: 1-CRUZ et al. 2000; 2-RODRIGUES et al. 2001; 3- CÂNDIDO et al. 2002; 4-TAMANINI et al. 2004.

A casca de jabuticaba apresentou o menor teor de celulose (20,63%) comparado com os demais resíduos apresentados no quadro 5. A quantidade de hemicelulose (13,69%) é semelhante à de *Eucalyptus globulus* (17,1%) e bem inferior comparado com o restante de materiais. Em relação ao teor de lignina, a quantidade presente na casca de jabuticaba (24,33%) é semelhante aos demais resíduos apresentados. Essas diferenças provavelmente estão relacionadas à variabilidade existente entre as diferentes espécies e da não determinação da quantidade de holocelulose presente nas amostras, visto que, a holocelulose é composta de celulose e hemicelulose.

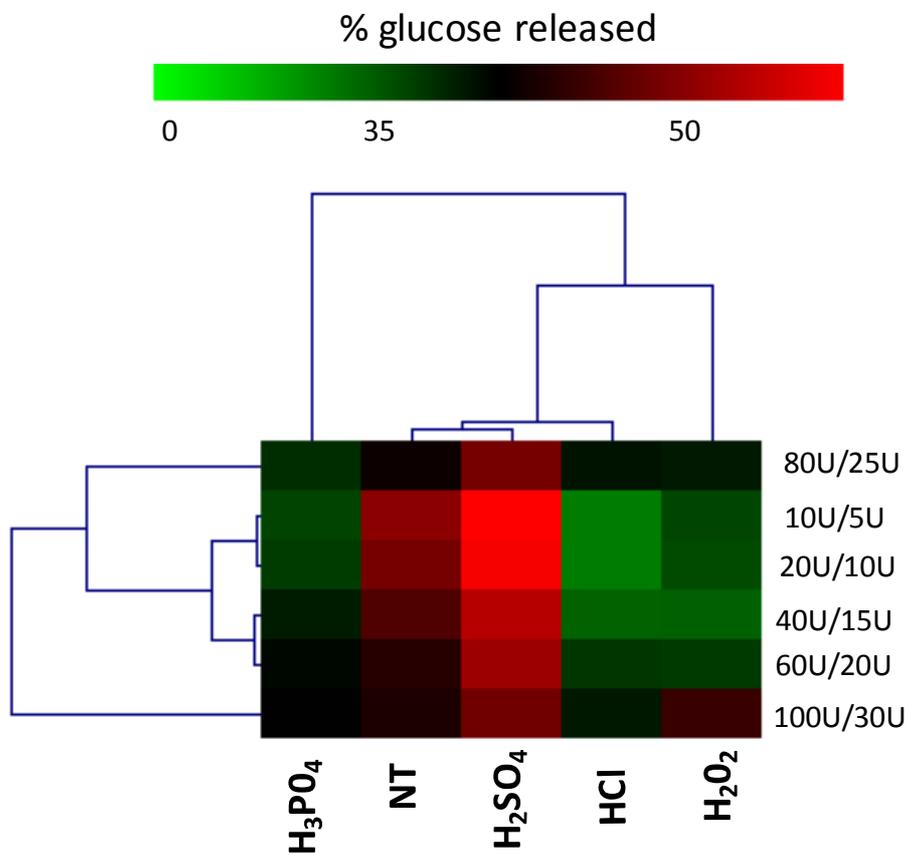
A utilização de matérias-primas lignocelulósicas para a obtenção de açúcares fermentescíveis vem ganhando grande interesse e investimento. Essa

matéria-prima apresenta uma complexa estrutura da parede celular que geralmente se torna resistente à bioconversão. Devido a essa recalcitrância da biomassa lignocelulósica, se faz necessário uma etapa de pré-tratamento que tem por finalidade, alterar ou remover a lignina e a hemicelulose, aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, o que acarreta em aumento na digestibilidade do complexo enzimático e, conseqüentemente, em elevados rendimentos em açúcar (SANTOS et al., 2012).

A fim de comprovar tal ação do pré-tratamento no aumento da concentração final de açúcares, este presente trabalho comparou os níveis obtidos através da biomassa da casca de jabuticaba antes e após o pré-tratamento frente à hidrólise enzimática em diferentes tempos reacionais para a biomassa utilizada.

Diante dos resultados obtidos por GOULART (2010) verifica-se que o melhor pré-tratamento para biomassa da casca de jabuticaba, onde a mesma apresenta o nível mais elevado de porcentagem de glicose ao final da hidrólise, é utilizando o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído 1% (m/v) e uma concentração de celulase e  $\beta$ -glicosidase de 20U/10U respectivamente, conforme podemos observar no heat map da figura 16.

Figura 16- Porcentagem de glicose liberada após a hidrólise de cascas de jabuticaba tratados utilizando enzimas comerciais (celulase e  $\beta$ -glicosidase) sob diferentes concentrações..



Fonte: GOULART, 2010.

Para verificar o efeito físico do pré-tratamento ácido, foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) na casca de jabuticaba antes do pré-tratamento e após o pré-tratamento com ácido sulfúrico 1% (m/v). Os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV) estão apresentados nas figuras 17 e 18 respectivamente.

Figura 17- Microscopia eletrônica de varredura da casca de jabuticaba antes do tratamento.

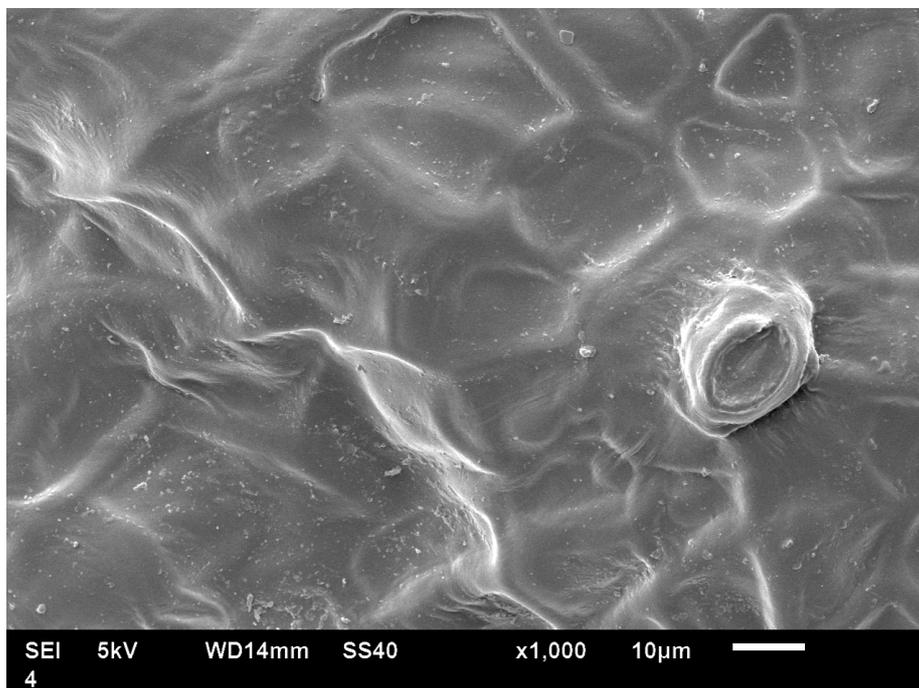
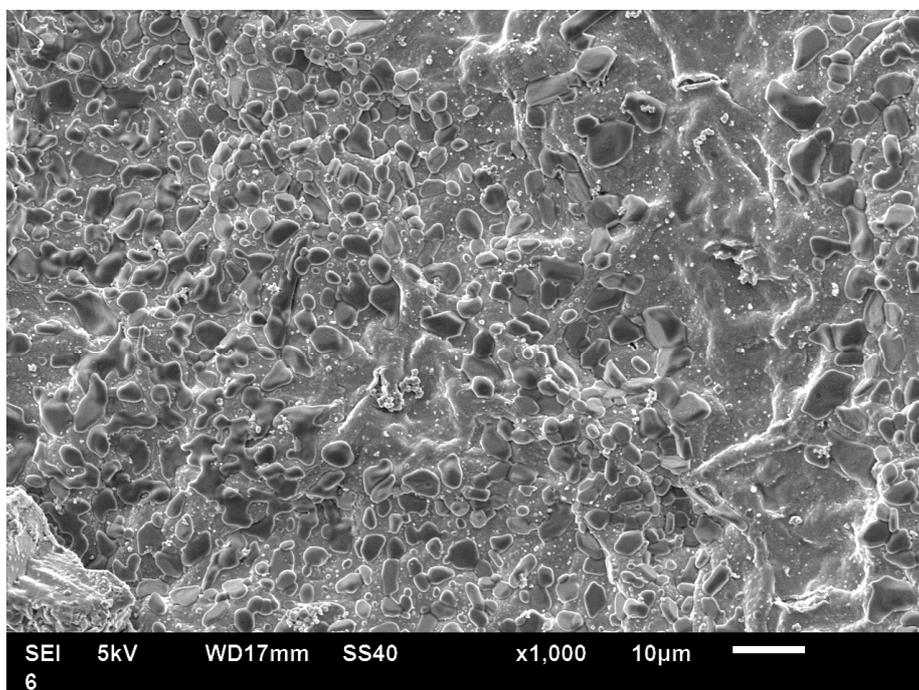


Figura 18- Microscopia eletrônica de varredura da superfície da casca de jabuticaba após o tratamento com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 1%.



Na figura 17 podemos observar que a epiderme externa da casca de jabuticaba encontra-se bem conservada, o que caracteriza o efeito recalcitrante dessa biomassa sem um tratamento prévio. Na figura 18 observamos um aumento no tamanho dos poros da estrutura da parede celular vegetal, o que pode favorecer a acessibilidade das enzimas para a hidrólise subsequente da celulose. O pré-tratamento ácido tem a função de hidrolisar a hemicelulose e solubilizar parte da celulose amorfa ou de baixa cristalinidade, tornando assim a fração celulósica remanescente mais susceptível à ação das celulases (SANTOS et al., 2012).

Para verificar a eficiência da remoção de lignina e exposição da celulose requerida pelo pré-tratamento, foi realizada a análise termogravimétrica da casca de jabuticaba sem o pré-tratamento e após o pré-tratamento com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%. As figuras 19 e 20 mostram os resultados obtidos respectivamente.

Figura 19- Termograma da casca de jabuticaba antes do pré- tratamento.

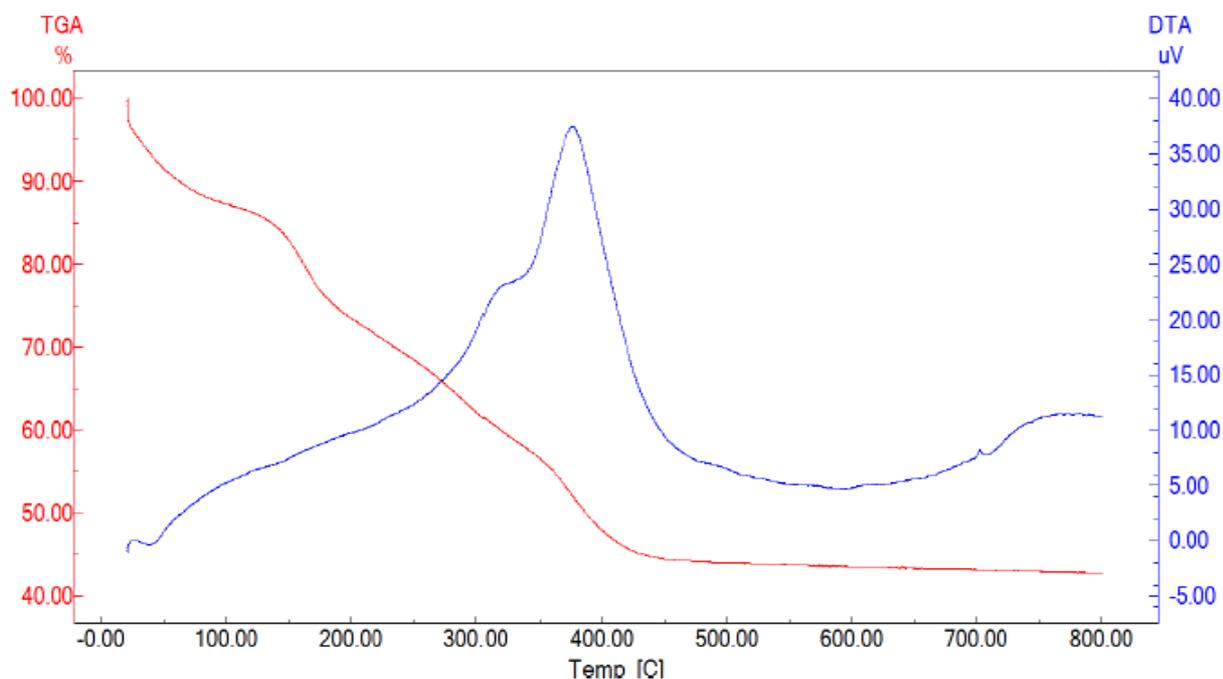
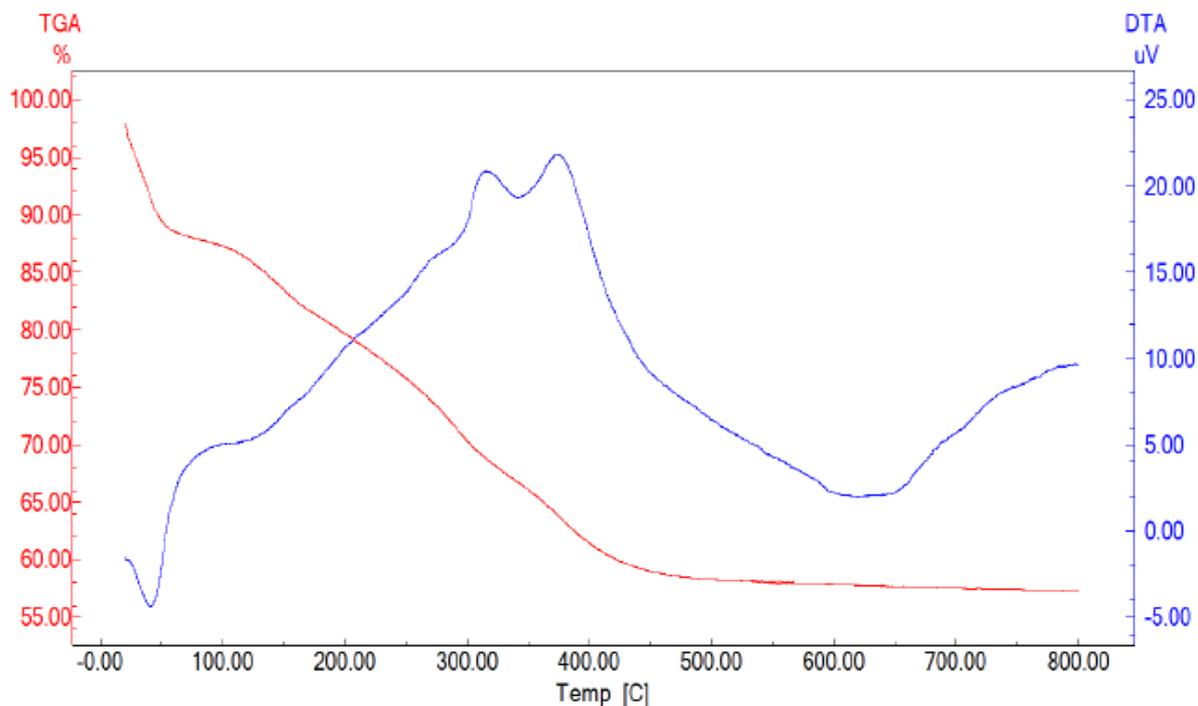


Figura 20- Termograma da casca de jabuticaba após o tratamento com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 1%.



Conforme RAMBO et al. (2015) as biomassas lignocelulósicas apresentam um comportamento típico de degradação térmica, com três etapas bem definidas: na faixa de 50 a 100 °C ocorre a liberação de umidade, no intervalo de 250 a 400 °C ocorre a decomposição de carboidratos (hemicelulose e celulose), acima de 400 °C há uma degradação contínua e lenta associada à lignina e ao final do processo ocorre a formação de carvão e cinzas.

Na figura 19 e 20 podemos observar que as curvas de perda de massa mostram 4 etapas definidas, a primeira ocorre de 50°C à 100°C, a segunda de 280°C à 350°C, a terceira de 350°C a 450°C e a quarta na região de 450°C à 800°C. Para a amostra não tratada (Figura 19) observamos que na primeira faixa houve uma perda de massa de 4,62%, no intervalo da segunda faixa ocorreu uma

perda de massa de 12,93%, na terceira faixa uma perda de 21,34% e na última etapa uma perda de 3,86%. Para a amostra tratada (Figura 20) observamos que na primeira faixa houve uma perda de massa de 2,44%, no intervalo da segunda faixa ocorreu uma perda de massa de 9,20%, na terceira faixa uma perda de 10,76% e na última etapa uma perda de 2,93%.

Comparando os termogramas obtidos com a casca de jabuticaba tratada e não tratada observamos que no primeiro evento onde corresponde a perda de massa referente à perda da água absorvida do biomaterial no intervalo de temperatura de 50 a 100 °C, a amostra não tratada apresentou aproximadamente o dobro de perda de massa. No segundo evento ocorre à degradação da hemicelulose e celulose, termicamente menos estáveis que a lignina, no material não tratado houve uma perda de massa maior do que o material tratado de aproximadamente 3,73%. No terceiro intervalo onde ocorre a degradação da lignina verificamos que houve uma perda de 10,58% a mais no material não tratado em relação ao que sofreu tratamento prévio. Na última faixa não houve uma diferença significativa na perda de massa dos materiais.

Com esse comparativo podemos observar o pré-tratamento foi eficaz na diminuição da lignina no material lignocelulósico, visto que, houve uma diferença significativa na perda de massa do terceiro evento, mostrando uma maior quantidade de lignina exposta a sofrer a degradação térmica. No segundo evento podemos verificar que após a hidrólise enzimática, a disponibilização de celulose para a degradação térmica foi maior na amostra não tratada, corroborando assim para os resultados obtidos para a determinação de açúcares por CLAE.

A partir dos cromatogramas obtidos do CLAE foi possível determinar as concentrações de açúcares redutores e avaliar a efetividade do pré-tratamento na

disponibilização dos mesmos, bem como avaliar qual o melhor tempo para que a biodegradação da biomassa expresse uma maior quantidade dos açúcares de interesse.

Na figura 21 está apresentado a relação dos cromatogramas obtidos com a hidrólise enzimática empregando celulase e  $\beta$ -glicosidase 20U/10U na casca de jabuticaba sem o pré-tratamento (ST) e tratadas com ácido sulfúrico 1% (m/v) (T). Os tempos reacionais foram de 24, 48, 72, 96 e 120 horas e estão demonstrados na figura 18 com a legenda de A, B, C, D e E respectivamente.

Como podemos observar na figura 22, a melhor expressão de açúcares em qualquer tempo reacional, foi a biomassa tratada com ácido sulfúrico 1% (m/v), isso ocorre, pois o pré-tratamento tem a característica de aumentar a susceptibilidade da associação celulose-lignina e assim melhorou a hidrólise enzimática. A taxa e a extensão da degradação enzimática da celulose são relacionadas inversamente ao índice de lignina. Para a enzima celulase catalisar a hidrólise da celulose, deve existir um contato direto entre as microfibras da celulose e o complexo enzimático, de forma que a taxa de hidrólise enzimática da celulose é profundamente afetada pela estrutura do material lignocelulósico.

Um pré-tratamento é considerado eficiente se a acessibilidade ao ataque enzimático é maximizada e se a formação dos co-produtos inibidores for minimizada. A realização destes requerimentos é necessária para tornar um processo economicamente viável (RABELO, 2007).

Os principais açúcares obtidos nesse ensaio a partir da hidrólise enzimática foram cellopentose, cellotriose, glucose, galactose, arabinose, xilitol, celobiose, gentiobiose, soforose, ácido acético, ácido glucorônico.

Observando os dados da tabela 1 podemos avaliar que o tempo para a hidrólise enzimática de 72h foi onde se obteve a melhor expressão de açúcares e que à medida que o tempo reacional aumentou, o nível de açúcares diminuiu.

A explicação para tal fato pode ser um efeito inibitório dos produtos sobre as enzimas, já que a atividade das endoglucanases é inibida pela celobiose e a  $\beta$ -glicosidase é inibida por glicose (SANTOS, 2009).

Além disso, diversos produtos de degradação, tais como o ácido fórmico, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis, produzidos durante o pré-tratamento e a hidrólise, podem inibir o processo de fermentação e afetar rendimentos do etanol, devendo assim ser removidos ou suavizados (RABELO, 2007).

De acordo com OLSSON e HAHN-HÄGERDAL (1996), existem quatro grupos de inibidores da fermentação de um hidrolisado lignocelulósico. São eles: 1) as substâncias liberadas durante a pré-hidrólise e hidrólise, incluindo o ácido acético (liberado da degradação da estrutura da hemicelulose) e os extrativos (terpenos, alcoóis e compostos aromáticos tais como taninos); 2) um grupo de sub-produtos (furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido levulínico, ácido fórmico e substâncias húmicas) provenientes da degradação dos açúcares durante o processo da pré-hidrólise e hidrólise; 3) os produtos de degradação da lignina também produzidos durante a pré-hidrólise e hidrólise, incluindo uma grande variedade de compostos aromáticos e poliaromáticos com uma variedade de substituintes; 4) os metais liberados dos equipamentos de hidrólise e aditivos, tais como,  $SO_2$ .

Conhecendo-se o efeito inibitório, que a fração de hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente que a fração de celulose e que os monossacarídeos liberados da hemicelulose são expostos no meio reacional por muito tempo,

observamos que isso leva a degradação e perda desses açúcares. Isso explica o fato das concentrações obtidas com 96h e principalmente com 120h terem sido as de menor expressão.

Figura 21- Cromatogramas de CLAE obtidos a partir da hidrólise enzimática empregando celulase e  $\beta$ -glicosidase 20U/10U na casca de jabuticaba sem o pré-tratamento (ST) e tratadas com ácido sulfúrico 1% (m/v) (T). Os tempos reacionais foram de 24, 48, 72, 96 e 120 horas e estão demonstrados na figura 18 com a legenda de A, B, C, D e E respectivamente.

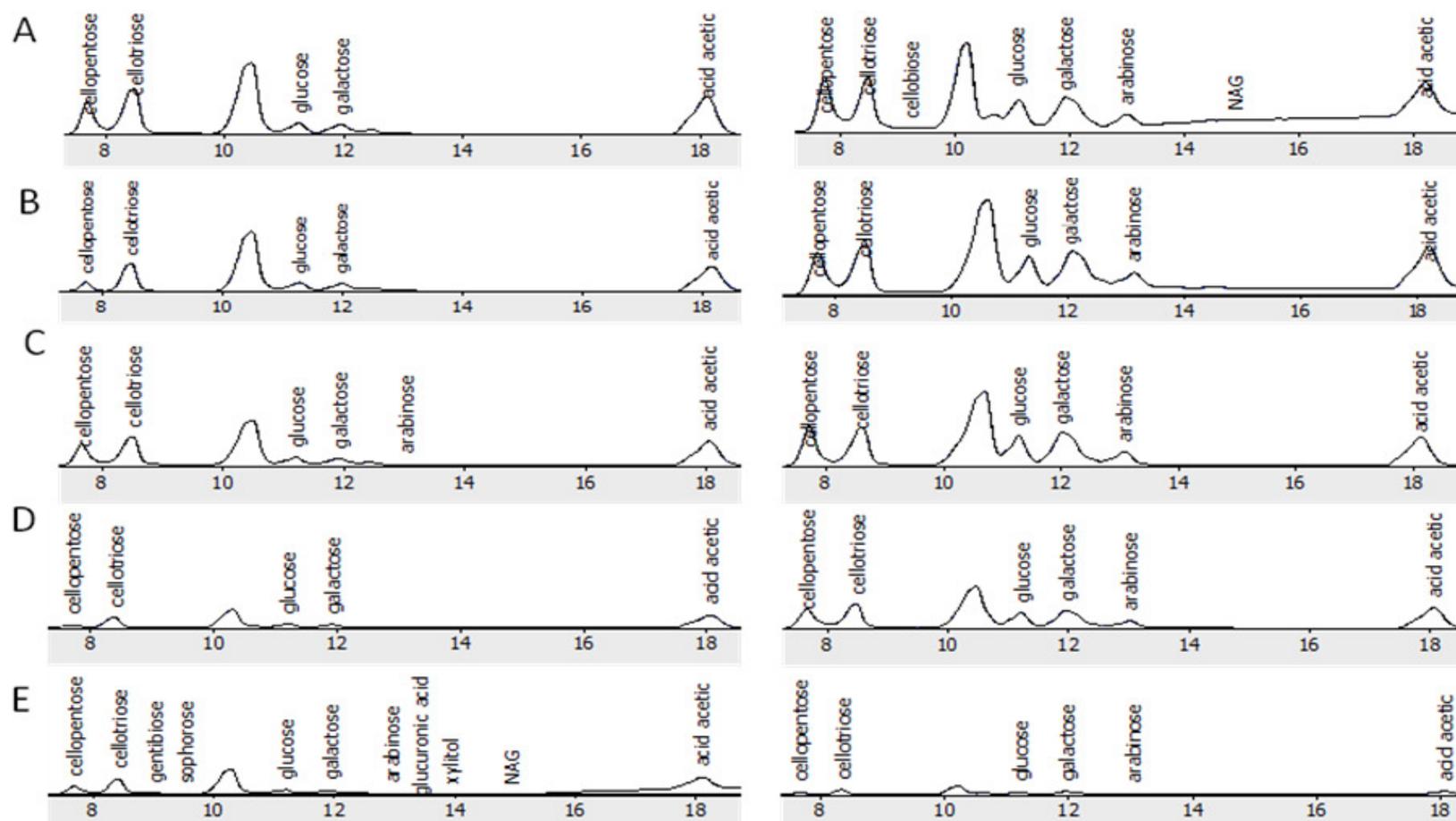


Tabela 1 - Concentração em  $\mu\text{g/mL}$  dos açúcares obtidos após a hidrólise enzimática da casca de jabuticaba sem pré-tratamento (ST) e Tratadas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% (T) nos tempos reacionais de 24, 48, 72, 96 e 120h em relação à 10g de casca se jabuticaba.

Tempo (min)		24		48		72		96		120	
Açúcares (mM)	R.T (min)	ST	T	ST	T	ST	T	ST	T	ST	T
Cellotriose	8,477	2376	2821	1308	2862	2923	4212	881	2363	1599	356
Gentibiose	9,125	-	-	-	-	-	-	-	-	213	-
Celobiose	9,344	-	290	-	-	-	-	-	-	-	-
Soforose	9,555	-	-	-	-	-	-	-	-	23	-
Glucose	11,323	2684	1084	2360	9347	3850	14559	1665	7314	2739	1120
Galactose	11,963	3050	11372	2539	28236	4241	26130	1683	13195	4218	2033
Arabinose	13,04	-	559	-	2331	96	1697	-	841	122	114
Ácido glucurônico	13,435	-	-	-	-	-	-	-	-	71	-
Xilitol	14,011	-	-	-	-	-	-	-	-	203	-
NAG	14,853	-	436	-	-	-	-	-	-	19	-
Ácido acético	18,069	170006	159519	121452	229297	208461	261331	106299	175878	107709	26316

## 6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

- Para a utilização da biomassa da casca de jabuticaba como matéria-prima para a hidrólise enzimática visando uma melhor obtenção de açúcares fermentescíveis, é necessário que seja realizado um pré-tratamento antes da hidrólise;
- A sacarificação enzimática da fração celulósica da casca de jabuticaba aumenta a expressão de açúcares significativamente após a etapa de pré-tratada com ácido sulfúrico diluído a 1% (m/v);
- A análise da biomassa por Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) sugere a grande alteração na superfície do material lignocelulósico após a ação do pré-tratamento químico, deixando as fibras celulósicas mais acessíveis à sacarificação enzimática;
- A análise termogravimétrica forneceu resultados de perda de massa em função da mudança da temperatura que nos possibilitaram avaliar que o pré-tratamento na casca de jabuticaba diminuiu a quantidade de lignina do material e conseqüentemente após a hidrólise enzimática houve uma menor disponibilização de celulose e hemicelulose para a degradação térmica.
- Os principais açúcares obtidos a partir da hidrólise enzimática da casca de jabuticaba foram: cellopenteose, cellotriose, glucose, galactose, arabinose, xilitol, celobiose, gentiobiose, soforose, ácido acético, ácido glucorônico;

- O melhor tempo reacional para a hidrólise enzimática onde obteve-se o maior nível de açúcares foi de 72h;
- O menor nível de açúcares foram obtidos com os maiores tempos reacionais (96h e 120h). Um possível fator responsável por este resultado pode ser o efeito inibitório dos produtos formados durante o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática;

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. **Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas.** *Quim. Nova*, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.

AUGUSTA, M. I.; RESENDE, J. M.; BORGES, S. V.; MAIA, M. C. A.; COUTO, M. A. P. G. **Caracterização física e química da casca e polpa de jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*, (L.) Merryl & Perry).** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 30(4): 928-932, 2010.

ASCHERI, D. P. R.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. **Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 4, 2006.

ASQUIERI, E. R.; DAMIANI, C.; CANDIDO, M. A.; ASSIS, E. M. **Vino de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg): estudo de las características físico-químicas y sensoriales de los vinos tintos seco y dulce, fabricados con la fruta integral.** *Alimentária*, n. 355, p. 111-121, 2004.

BROWNING, B.L. *The Chemistry of Wood.* New York, Interscience Publisher, p.574, 1963. GOLDSCHIMID, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions.** New York: John Wiley Interprice, p. 241-298, 1971.

BRUNINI, M. A., OLIVEIRA, A. L.; SALANDINI, C. A. R.; BAZZO, F. R. **Influência de Embalagens e Temperatura no Armazenamento de Jabuticabas (*Myrciaria Jabuticaba* (Vell) Berg) Cv 'Sabará'.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 24(3): 378-383, 2004.

CÂNDIDO, E. J.; CANILHA, L.; SILVA, J. B. A. **Determinação da composição química da palha de trigo.** In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 7., 2002, Maringá. *Anais. Maringá: UEM*, p. 108, 2002.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. **Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais**. *Quim. Nova*, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CORRÊA, M. O. G.; PINTO, D. D.; ONO, E. O. **Análise da atividade respiratória em frutos de jabuticabeira**. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 831-833, 2007.

CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. **Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol**. *Food biotechnology*, New York, v. 14, p. 79-97, 2000.

D'ALMEIDA, M. L. O. **Composição química dos materiais lignocelulósicos**. In: *Celulose e Papel- Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica*, 2 ed., v. 1, São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, 1988.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. **Colorimetric method form determination of sugars and related substaces**. *Nature*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. **Cellulose hydrolysis**. New York: Springer-Verlag, 1987.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure and Reactions**. 1.ed., Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERRAZ, F.O. **Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol**. Lorena: USP, 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, 2010.

GOLDEMBERG, J. **Biomassa e energia**. *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, p. 582-587, 2009.

GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. **Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 25(4): 825-827, 2005.

GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira.** 11 ed. São Paulo: Nobel, p.446, 1987.

GOULART, R. R. **Comparação de diferentes estratégias de pré-tratamento para hidrólise enzimática da biomassa de jabuticaba para produção de etanol de segunda geração.** Anápolis: UEG, 2010. 21 f. Monografia- Unidade universitária de ciências exatas e tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, 2010.

HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. **Em Pulp and Paper Chemistry and Technology.** Ek, M.; Gellerstedt, G.; Henriksson, G., eds.; Stocolm: De Gruyter, v. 1, cap. 4, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 1 ed. Digital. ZENEBON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. (Coord.). São Paulo: INSTITUTO ADOLFO LUTZ, p. 1020. 2008.

JEFFRIES, T. W. **Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes.** Biodegradation, v.1, p.163-176, 1990.

LIMA, A. J. B.; CORRÊA, A. D.; ALVES, A. P. C.; ABREU, C. M. P.; DANTAS-BARROS, M. P. **Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações.** *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v. 58, n. 4, 2008.

LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, S. D. **Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues.** *Appl Biochem Biotechnol.* 98(100): 641-54, 2002.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. **Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (3): 506-77, 2002.

MARQUES, A.; CHICAYBAM, G.; ARAUJO, M. T.; MANHÃES, L. R. T.; SABAA-SRUR, A. U. O. **Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*mangifera indica* L.) cv. tommy Atkins.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 32, n. 4, p. 1206-1210, 2010.

MARTINS, L. F. **Caracterização do Complexo Celulásico de *Penicillium echinulatum*.** Curitiba: UFPR, 2005. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 2005.

MONTE, J. R. **Sacrificação da polpa celolósica do bagaço de cana-de-açúcar com celulasas e xilanases de *Thermoascus aurantiacus*.** Lorena: USP, 2009. 138 f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, 2009.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, E. B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** Bioresour Technol. 96(6): 673-86, 2005.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production.** Enzyme and Microbial Technology. v. 18, p. 312-331, 1996.

PEREIRA, M. C. T.; SALOMÃO, L. C. C.; MOTA, W. F. da; VIEIRA, G. **Atributos físicos e químicos de frutos de oito clones de jaboticabeiras.** Revista Brasileira de Fruticultura, v.22, p.16-21, 2000.

PEREIRA, R. S. **Efeito do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído sobre a bioconversão de xilose em xilitol.** Lorena: USP, 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha d cana-de-açúcar a bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.** Curitiba: UFPR, 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 2007.

POPENOE, W. **Manual of tropical and subtropical fruits**. Hafner Press, p.299-302, 1974.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para hidrólise enzimática de cana-de-açúcar**. Campinas: UNICAMP, 2007. 180 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, 2007.

RAMBO, M. K.D.; RAMBO, M. C. D.; ALMEIDA, K. J. C. R.; ALEXANDRE, G. P. **Estudo de análise termogravimétrica de diferentes biomassas lignocelulósicas utilizando a análise por componentes principais**. Ciência e Natura, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-868, 2015.

RAMOS, L. P. **The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials**. Química Nova, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. **Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos**. Química Nova, São Paulo, v. 21, n. 2, p.140-143, 1998.

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; PESSOA JR, A.; PRATA, A. M. R. **Crescimento de Candida guilliermondii durante cultivo descontínuo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: efeito do O<sub>2</sub>** . In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, 2003, Florianópolis. Anais. Florianópolis, 2003. CDROM.

SAAD, S.M.; NADA, A.M.A.; IBRAHIN, A.A.; TAWFIK, H. Soda Anthraquinone Pulping Bagasse. *Holzforschung*. v. 42, n.1, p. 67–69, 1988. Disponível em: TAPPI – Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Standard Methods.T 236 om-06 - Tappi Test Methods, 2006.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. **Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 27-33, 2009.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. **Potencial da Palha de Cana-De-Açúcar para Produção de Etanol.** Quim. Nova, v. 35, n. 5, p.1004-1010, 2012.

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico.** Lorena: USP, 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. **Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos.** Quim. Nova, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SJÖTRÖM, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications.** 2.ed. California, USA: Academic Press, 1992.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica.** New York: Jonh Wiley & Sons, 1996.

TAMANINI, C.; OLIVEIRA, A. S.; FELIPE, M. G. A.; CANETTIERI, E. V.; CÂNDIDO, E. J.; HAULY, M. C. O. **Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol.** Acta Scientiarum. Technology, Maringá, v. 26, n. 2, p. 117-125, 2004.

TAPPI - Technical Association of Pulp and Paper Industry. Standard Method T 222 om-11 – Tappi Test Methods, 2011.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. **Chemical Principles of Textile Conservation.** Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998.

WOOD, T. M. **Mechanisms of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi.** In: Coughlan, M. P. (Ed) **Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation.** London: Elsevier, p. 17-35, 1989.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. **Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies.** *Bioresour Technol.* 96 (18): 1959-66, 2005.

ZHANG, Y. H. P.; DING, S. Y.; MIELENZ, J. R.; CUI, J. B.; ELANDER, R. T.; LASER, M.; HIMMEL, M.E.; MCMILLAN, J. R.; LYND, L. R. **Fractionating Recalcitrant Lignocellulose at Modest Reaction Conditions.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, n. 2, 2007.